

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

# PCT

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>M/38030-PCT</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 98/ 05360</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>24/08/1998</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>22/08/1997</b>
Anmelder  <b>GIESING, Michael et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nichtrecherchierbar erwiesen (siehe Feld I).
2. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).
3. ☐ In der internationalen Anmeldung ist ein Protokoll einer Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz offenbart; die internationale Recherche wurde auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt,
  - ☐ das zusammen mit der internationalen Anmeldung eingereicht wurde.
  - ☐ das vom Anmelder getrennt von der internationalen Anmeldung vorgelegt wurde,
    - ☐ dem jedoch keine Erklärung beigelegt war, daß der Inhalt des Protokolls nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung in der eingereichten Fassung hinausgeht.
  - ☐ das von der Internationalen Recherchenbehörde in die ordnungsgemäße Form übertragen wurde.
4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt.
5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**
  - ☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
  - ☐ wurde der Wortlaut nach Regel 43 (2) in der Feld III angegebenen Fassung von dieser Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Internationalen Recherchenbehörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung des internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.
6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen:
 

Abb. Nr.

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
 ☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 IPK 6 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 35808 A (CENTOCOR BV ;BRAKENHOFF RUDOLF HENRIKUS (NL); DONGEN AUGUSTINA ANT) 14. November 1996 siehe das ganze Dokument ----	1,2,4-9, 11,13,14
X	WO 96 17080 A (IMP CANCER RES TECH ;SELBY PETER JOHN (GB); BURCHILL SUSAN ANN (GB) 6. Juni 1996 siehe das ganze Dokument ----	1-3,5-7, 9,13,15, 16
X	WO 94 10343 A (UNIV JEFFERSON) 11. Mai 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ----	1,2,5-7, 9,11,13
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>o</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Februar 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18/02/1999

 Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Knehr, M

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 29430 A (WAYNE JOHN CANCER INST ;NAT GENETICS INST (US)) 26. September 1996  siehe das ganze Dokument ---	1-3,6,8, 9,11,13, 15,16
X	PANTEL K AND RIETHMÜLLER G: "Methods for detection of micrometastatic carcinoma cells in bone marrow, blood, and lymph nodes" ONKOLOGIE, Bd. 18, 1995, Seiten 394-401, XP002092612 siehe das ganze Dokument ---	1-6,9, 13,14
X	PELKEY J P ET AL.: "Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastases from solid tumors" CLINICAL CHEMISTRY, Bd. 42, Nr. 9, 1996, Seiten 1369-1381, XP002092613 siehe Zusammenfassung siehe Seite 1369, Spalte 1, Absatz 1 - Seite 1370, Spalte 1, Absatz 1 siehe Seite 1373, Spalte 1, Absatz 3 - Seite 1375, Spalte 2, Absatz 3; Tabelle 4 ---	1-4,6-9, 13
X	NOGUCHI S ET AL.: "The detection of breast carcinoma micrometastasis in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction" CANCER, Bd. 74, Nr. 5, 1994, Seiten 1595-1600, XP002092614 siehe Zusammenfassung siehe Seite 1595, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 1597, Spalte 2, Absatz 1; Abbildungen 1-4; Tabelle 1 ---	1-3,6,7, 9,13
X	PITTMAN K ET AL.: "Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for expression of tyrosinase to identify malignant melanoma cells in peripheral blood" ANNALS OF ONCOLOGY, Bd. 7, 1996, Seiten 297-301, XP002092615 siehe Zusammenfassung siehe Seite 297, Spalte 1, Absatz 1 - Seite 298, Spalte 2, Absatz 2; Abbildungen 1-3; Tabelle 1 ---	1-3,6,9, 13
	---	
	-/--	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>JUNG R ET AL.: "Quality management and influential factors for the detection of single metastatic cancer cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction" EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY AND CLINICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 35, Nr. 1, 1997, Seiten 3-10, XP002092616  siehe Zusammenfassung  siehe Seite 3, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 5, Spalte 1, Absatz 7  siehe Seite 6, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 7, Spalte 1, Absatz 3; Abbildungen 1,4; Tabelle 1</p> <p>---</p>	1-3,6,7, 9,12,13
X	<p>VAN DER VELDE-ZIMMERMANN D ET AL.: "Molecular test for the detection of tumor cells in blood and sentinel nodes of melanoma patients" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 149, Nr. 3, 1996, Seiten 759-764, XP002092617  siehe Zusammenfassung  siehe Seite 759, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 761, Spalte 1, Absatz 2  siehe Seite 762, Spalte 1, Absatz 3 - Seite 763, Spalte 1, Absatz 1; Abbildung 1; Tabelle 1</p> <p>---</p>	1-3,6,7, 9,13
X	<p>BURCHILL S A ET AL.: "Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase - polymerase chain reaction" BRITISH JOURNAL OF CANCER, Bd. 71, 1995, Seiten 278-281, XP002092618  siehe Zusammenfassung  siehe Seite 278, Spalte 1, Absatz 1 - Seite 279, Spalte 1, Absatz 2; Abbildungen 1-4</p> <p>---</p>	1-3,6,7, 9,13
X	<p>SMYTH M J ET AL.: "Antitumor activity of idarubicin-monoclonal antibody conjugates in a disseminated thymic lymphoma model" CANCER RESEARCH, Bd. 51, 1991, Seiten 310-317, XP002092619  siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	14
Y	<p>WO 97 07242 A (LEHRER STEVEN)  27. Februar 1997  siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1,2,5-9, 11,13
	<p>---</p> <p>-/--</p>	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	SCHMITZ-DRÄGER B J ET AL.: "Molecular biology of dissemination in bladder cancer - laboratory findings and clinical significance" WORLD JOURNAL OF UROLOGY, Bd. 14, 1996, Seiten 190-196, XP002092620 siehe das ganze Dokument -----	1,2,4-9, 11,13
Y	WO 95 16792 A (STROUN MAURICE ;ANKER PHILIPPE (CH); VASIOUKHIN VALERI (US)) 22. Juni 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1,2,4,6, 7,13

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9635808	A	14-11-1996	AU EP	2375895 A 0828852 A	29-11-1996 18-03-1998
-----					
WO 9617080	A	06-06-1996	NONE		
-----					
WO 9410343	A	11-05-1994	CA EP JP US US US	2148350 A 0667920 A 8502889 T 5506106 A 5674682 A 5688649 A	11-05-1994 23-08-1995 02-04-1996 09-04-1996 07-10-1997 18-11-1997
-----					
WO 9629430	A	26-09-1996	AU EP	5310296 A 0871768 A	08-10-1996 21-10-1998
-----					
WO 9707242	A	27-02-1997	NONE		
-----					
WO 9516792	A	22-06-1995	CH AU GB	686982 A 1075695 A 2299166 A,B	15-08-1996 03-07-1995 25-09-1996

# PATENT COOPERATION TREATY

**PCT**

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing</b> (day/month/year) 17 May 1999 (17.05.99)	
<b>International application No.</b> PCT/EP98/05360	<b>Applicant's or agent's file reference</b> M/38030-PCT
<b>International filing date</b> (day/month/year) 24 August 1998 (24.08.98)	<b>Priority date</b> (day/month/year) 22 August 1997 (22.08.97)
<b>Applicant</b> GIESING, Michael et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
22 March 1999 (22.03.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	<b>Authorized officer</b> Pamella AMALLO-ELOTU
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

REC'D 29 NOV 1999

WIPO PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts M/38030-PCT	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05360	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 24/08/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 22/08/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder GIESING, Michael et al.		

1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 6 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.  
  
☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 3 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☒ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☒ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  22/03/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  24. 11. 99
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Linker, W  Tel. Nr. +49 89 2399 8703 



# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05360

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-89                      ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-17                      eingegangen am                      06/10/1999    mit Schreiben vom                      06/10/1999

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung,                      Seiten:
- ☐ Ansprüche,                      Nr.:
- ☐ Zeichnungen,                      Blatt:

3. ☒ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

**siehe Beiblatt**

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	10
	Nein: Ansprüche	1-9, 11-16
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1-16
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-16
	Nein: Ansprüche	

### 2. Unterlagen und Erklärungen

**siehe Beiblatt**

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER  
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/EP98/05360

---

**VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

**siehe Beiblatt**

**VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

**siehe Beiblatt**

**Zu Punkt I**

**Grundlage des Berichts**

Der neu eingereichte Anspruch 1 ist auf ein Verfahren zur multiplen Charakterisierung disseminierter und makrometastasierter Krebszellen gerichtet, wobei wenigstens auf zwei verschiedene Gene untersucht werden soll (siehe Seite 19, Zeile 14-19). Dieser Aspekt geht jedoch aus der Formulierung des Anspruchs nicht hervor, bei dem wenigstens auf ein krebsspezifisches Gen in "Zellen" und "Krebszellen" untersucht wird. Des weiteren macht die Streichung des Merkmals "und die gleiche Untersuchung mit Nichtkrebszellen .." im Hinblick auf Seite 4, Zeile 22-26 den Anspruch unklar und scheint auch über den Offenbarungsgehalt der ursprünglichen Unterlagen hinauszugehen, da im Referenzbeispiel 11 auch mit Normallymphozyten verglichen wird. Die neu eingereichten Ansprüche erfüllen daher nicht die Erfordernisse der Artikel 19(2) und 6 PCT.

Unter Punkt V wird daher zu den ursprünglich eingereichten Ansprüchen Stellung genommen.

**Zu Punkt V**

**Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: WO 96 35808 A (CENTOCOR BV ;BRAKENHOFF RUDOLF HENRIKUS (NL); DONGEN AUGUSTINA ANT) 14. November 1996
- D2: WO 96 17080 A (IMP CANCER RES TECH ;SELBY PETER JOHN (GB); BURCHILL SUSAN ANN (GB) 6. Juni 1996
- D3: WO 94 10343 A (UNIV JEFFERSON) 11. Mai 1994 in der Anmeldung erwähnt
- D4: WO 96 29430 A (WAYNE JOHN CANCER INST ;NAT GENETICS INST (US)) 26. September 1996

- D5: PANTEL K AND RIETHMÜLLER G: 'Methods for detection of micrometastatic carcinoma cells in bone marrow, blood, and lymph nodes' ONKOLOGIE, Bd. 18, 1995, Seiten 394-401,
- D6: PELKEY J P ET AL.: 'Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastases from solid tumors' CLINICAL CHEMISTRY, Bd. 42, Nr. 9, 1996, Seiten 1369-1381
- D7: NOGUCHI S ET AL.: 'The detection of breast carcinoma micrometastasis in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction' CANCER, Bd. 74, Nr. 5, 1994, Seiten 1595-1600
- D8: PITTMAN K ET AL.: 'Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for expression of tyrosinase to identify malignant melanoma cells in peripheral blood' ANNALS OF ONCOLOGY, Bd. 7, 1996, Seiten 297-301
- D9: JUNG R ET AL.: 'Quality management and influential factors for the detection of single metastatic cancer cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction' EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY AND CLINICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 35, Nr. 1, 1997, Seiten 3-10
- D10: VAN DER VELDE-ZIMMERMANN D ET AL.: 'Molecular test for the detection of tumor cells in blood and sentinel nodes of melanoma patients' AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 149, Nr. 3, 1996, Seiten 759-764
- D11: BURCHILL S A ET AL.: 'Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase - polymerase chain reaction' BRITISH JOURNAL OF CANCER, Bd. 71, 1995, Seiten 278-281
- D12: SMYTH M J ET AL.: 'Antitumor activity of idarubicin-monoclonal antibody conjugates in a disseminated thymic lymphoma model' CANCER RESEARCH, Bd. 51, 1991, Seiten 310-317
- D13: WO 97 07242 A (LEHRER STEVEN) 27. Februar 1997
- D14: SCHMITZ-DRÄGER B J ET AL.: 'Molecular biology of dissemination in bladder cancer - laboratory findings and clinical significance' WORLD JOURNAL OF UROLOGY, Bd. 14, 1996, Seiten 190-196
- D15: WO 95 16792 A (STROUN MAURICE ;ANKER PHILIPPE (CH); VASIOUKHIN VALERI (US)) 22. Juni 1995 in der Anmeldung erwähnt

Der Gegenstand der Ansprüche 1-9 und 11-16 scheint im Hinblick auf die entgegengehaltenen Dokumente D1-D15 weder neu noch erfinderisch zu sein (Artikel

33 (2) und (3) PCT. Im internationalen Recherchenbericht ist jeweils angegeben, welche Ansprüche durch welche Dokumente vorweggenommen werden.

Die Auswahl von geeigneten Genen gemäß vorliegendem Anspruch 10 scheint nur eine von mehreren naheliegenden Möglichkeiten zu sein, aus denen der Fachmann ohne erfinderisches Zutun den Umständen entsprechend auswählen würde, um die gestellte Aufgabe zu lösen, siehe insbesondere auch D8, Seite 300, rechte Spalte. Folglich liegt auch dem Gegenstand des Anspruchs 10 keine erfinderische Tätigkeit zugrunde (Artikel 33 (3) PCT).

#### **Zu Punkt VII**

##### **Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung**

Im Widerspruch zu den Erfordernissen der Regel 5.1 a) ii) PCT werden in der Beschreibung weder der in den Dokumenten D1, D2, D4-D14 offenbarte einschlägige Stand der Technik noch diese Dokumente angegeben.

#### **Zu Punkt VIII**

##### **Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung**

In Anspruch 1 sind die Formulierungen "anhand von DNA und/oder RNA (mRNA)" und "auf .. ein .. Gen untersucht" im Hinblick auf Seite 6, Zeilen 10-14 so vage und unbestimmt, daß der Gegenstand des Anspruchs unklar ist (Artikel 6 PCT). Weiterhin scheinen die durch die Formulierung "und/oder" entstandenen Kombinationsmöglichkeiten nicht durch die Beschreibung gestützt zu sein (Artikel 5 und 6 PCT).

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Verfahren zur multiplen Charakterisierung disseminierter und mikrometastasierter Krebszellen anhand von DNA und/oder RNA, wobei man aus Körperflüssigkeit eines Individuums gewonnene Zellen anhand von mRNA auf wenigstens ein krebsspezifisches Gen untersucht; und aus Körperflüssigkeit eines Individuums abgetrennte Krebszellen anhand von DNA und/oder mRNA auf wenigstens ein krebsspezifisches Gen untersucht.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß anhand von mRNA Expressionsanalysen derjenigen krebsspezifischen Gene vorgenommen werden, die bei Nichtkrebszellen der untersuchten Körperflüssigkeit im wesentlichen nicht exprimiert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man mRNA der Gene CEA, CK20, MUC1, Tyrosinase und/oder MAGE3 untersucht.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man genomische DNA der Gene p53, erb-B2, c-myc, K-ras, RB, APC und/oder DCC untersucht.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man genomische DNA auf Mutationen, Amplifikationen, LOH's, Translokationen und/oder Polymorphismen von Onkogenen und/oder mutierten Tumorsuppressor-Genen untersucht.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen und/oder die Krebszellen zusätzlich auf wenigstens ein krebsassoziiertes Gen untersucht.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man auf gewebsspezifische Gene, metastasierungsassoziierte Gene, Steroidhormonrezeptor-Gene, Chemoresistenz-Gene, und/oder Gene, die mit der Immunmodulation, Zellproliferation und/oder Apoptose korrelieren, untersucht.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man auf metastasierungsassoziierte Gene untersucht, die für Angiogenesefaktoren, Motilitätsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Matrixdegradationsfaktoren, wie Proteinasen und deren Hemmstoffe, und/oder Adhäsionsfaktoren, wie Adhaerine, kodieren.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man mRNA untersucht.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man mRNA der Gene bFGF, bFGF-R, VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2 MMP2 und/oder TIMP3 untersucht.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man Krebszellen aus der Körperflüssigkeit oder aus zellhaltigen Fraktionen davon durch Immunadsorption, Mikro-Filtration oder Dichtegradientenzentrifugation abtrennt.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man einzelne Krebszellen abtrennt und diese auch einzeln untersucht.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man eine an Krebszellen vorgenommene Untersuchung auch mit Nichtkrebszellen desselben Individuums zum Vergleich durchführt.
14. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur in-vitro Diagnose von Krebs.
15. Verwendung von disseminierten und mikrometastasierten, durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13 charakterisierten Krebszellen zum Testen von Wirkstoffen auf antineoplastische Wirkung.
16. Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 13, enthaltend geeignete Primer, Sonden und/oder Positiv-/Negativkontrollen und gegebenenfalls weitere zur Charakterisierung von DNA und/oder RNA übliche Mittel.
17. Mittel nach Anspruch 16 in Form einer Zusammenstellung von Test- und/oder Diagnosekits.



**Translation**

PATENT COOPERATION TREATY

# PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference <b>M/38030-PCT</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/EP98/05360</b>	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) <b>24 August 1998 (24.08.1998)</b>	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) <b>22 August 1997 (22.08.1997)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>C12Q 1/68</b>		
Applicant <b>GIESING, Michael</b>		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.  <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of <u>3</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input checked="" type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand <b>22 March 1999 (22.03.1999)</b>	Date of completion of this report <b>24 November 1999 (24.11.1999)</b>
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer  Telephone No. 49-89-2399-0

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP98/05360

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-89, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. 1-17, filed with the letter of 06 October 1999 (06.10.1999),  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☒ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

See Supplemental Box

**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

The newly submitted Claim 1 concerns a method for multiple characterization of disseminated and micrometastasized cancer cells, wherein the patient is examined for at least two different genes (cf. page 19, lines 14-19). This aspect, however, is not suggested by the formulation of the claim, in which the patient is examined for at least one cancer-specific gene in "cells" and "cancer cells". Furthermore, by deleting the feature, "and the same examination with non-cancerous cells ...", with regard to page 4, lines 22-26, the claim is unclear and also appears to go beyond the disclosure of the original document, since in reference example 11, a comparison is also made to normal lymphocytes. Therefore, the newly submitted claims do not meet the requirements of PCT Article 19(2) and 6.

Thus, the originally submitted claims were considered in Box V.

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/EP 98/05360

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	10	YES
	Claims	1-9, 11-16	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-16	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

This report makes reference to the following documents:

- D1: WO 96 35808 A (Centocor BV; Brakenhoff, Rudolf  
Henrikus (NL); Dongen Augustina Ant) November 14,  
1996
- D2: WO 96 17080 A (IMP Cancer Res Tech; Selby, Peter John  
(GB); Burchill, Susan Ann (GB) June 6, 1996
- D3: WO 94 10343 A (Univ Jefferson ) May 11, 1994,  
mentioned in the application
- D4: WO 96 29430 A (Wayne John Cancer Inst; Nat Genetics  
Inst (US)) September 26, 1996
- D5: Pantel, K. and Riethmüller, G.: 'Methods for detection  
of micrometastatic carcinoma cells in bone marrow,  
blood, and lymph nodes' Onkologie, vol. 18, 1995,  
pages 394-401
- D6: Pelkey, J. P. et al.: 'Molecular and immunological  
detection of circulating tumor cells and  
micrometastases from solid tumors' Clinical  
Chemistry, vol. 42, no. 9, 1996, pages 1369-1381
- D7: Noguchi, S. et al.: 'The detection of breast carcinoma  
micrometastasis in axillary lymph nodes by means of  
reverse transcriptase-polymerase chain reaction'  
Cancer, vol. 74, no. 5, 1994, pages 1595-1600
- D8: Pittman, K. et al.: 'Reverse transcriptase-polymerase

chain reaction for expression of tyrosinase to identify malignant melanoma cells in peripheral blood' Annals of Oncology, vol. 7, 1996, pages 297-301

- D9: Jung, R. et al.: 'Quality management and influential factors for the detection of single metastatic cancer cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction' European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, vol. 35, no. 1, 1997, pages 3-10
- D10: Van der Velde-Zimmermann, D. et al.: 'Molecular test for the detection of tumor cells in blood and sentinel nodes of melanoma patients' American Journal of Pathology, vol. 149, no. 3, 1996, pages 759-764
- D11: Burchill, S. A. et al.: 'Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction' British Journal of Cancer, vol. 71, 1995, page 278-281
- D12: Smyth, M. J. et al.: 'Antitumor activity of idarubicin-monoclonal antibody conjugates in a disseminated thymic lymphoma model' Cancer Research, vol. 51, 1991, pages 310-317
- D13: WO 97 07242 A (Lehrer, Steven) February 27, 1997
- D14: Schmitz-Dräger, B. J. et al.: 'Molecular biology of dissemination in bladder cancer - laboratory findings and clinical significance' World Journal of Urology, vol. 14, 1996, pages 190-196
- D15: WO 95 16792 A (Stroun, Maurice; Anker, Philippe (CH); Vasioukhin, Valeri (US)) June 22, 1995, mentioned in the application.

The subject matter of Claims 1-9 and 11-16 appears to be neither novel nor inventive with regard to the prior art documents D1-D15 (PCT Article 33(2) and (3)). The

international search report indicates which claims are anticipated by which documents.

The selection of suitable genes according to the present Claim 10 appears to be merely one of several obvious possibilities from which a person skilled in the art would choose depending on the circumstances in order to solve the specified problem, without an inventive step being involved (cf. in particular, D8, page 300, right column). Therefore, the subject matter of Claim 10 also does not involve an inventive step (PCT Article 33(3)).

**VII. Certain defects in the international application**

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Contrary to the requirements of PCT Rule 5.1(a)(ii), neither the relevant prior art disclosed in D1, D2, and D4-D14 nor these documents themselves have been indicated in the description.

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The formulations in Claim 1, "using DNA and/or RNA (mRNA)" and "examined for a ... gene" are so vague and ambiguous with regard to page 6, lines 10-14, that the subject matter of the claim is unclear (PCT Article 6).

Furthermore, the possible combinations arising from the formulation "and/or" do not appear to be supported by the description (PCT Articles 5 and 6).





(43) Internationales  
Veröffentlichungsdatum: 4. März 1999 (04.03.99)

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Charakterisierung disseminierter und mikrometastasierter Krebszellen anhand von DNA und/oder RNA, wobei man aus Körperflüssigkeit eines Individuums gewonnene Zellen anhand von mRNA auf wenigstens ein krebspezifisches Gen untersucht; und/oder aus der Körperflüssigkeit eines Individuums abgetrennte Krebszellen anhand von DNA und/oder mRNA auf wenigstens ein krebspezifisches Gen untersucht und die gleiche Untersuchung mit Nichtkrebszellen desselben Individuums zum Vergleich durchführt. Insbesondere untersucht man die Zellen und die Krebszellen zusätzlich auf wenigstens ein krebsassoziiertes Gen und führt die gleiche Untersuchung mit Nichtkrebszellen desselben Individuums zum Vergleich durch. Zu den krebspezifischen Genen zählen Onkogene, mutierte Tumorsuppressor-Gene und Gene, die bei Nichtkrebszellen in der untersuchten Körperflüssigkeit im wesentlichen nicht exprimiert werden. Die krebsassoziierten Gene sind beispielsweise gewebsspezifisch, korrelieren mit der Metastasierungsfähigkeit zirkulierender Krebszellen, kodieren für Steroidhormonrezeptoren, umfassen Chemoresistenz-Gene und/oder korrelieren mit der Immunmodulation, Zellproliferation oder Apoptose. Die vorliegende Erfindung betrifft vor allem die Verwendung des Verfahrens zur in-vitro Diagnose von Krebs. Sie betrifft auch die Verwendung von erfindungsgemäß charakterisierten, disseminierten und mikrometastasierten Krebszellen zum Testen von Wirkstoffen auf antineoplastische Wirkung sowie Mittel zur Durchführung des Verfahrens.

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

VERFAHREN ZUR CHARAKTERISIERUNG DISSEMINIERTER UND  
MIKROMETASTASIERTER KREBSZELLEN

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Charakterisierung disseminierter und mikrometastasierter Krebszellen anhand von RNA und/oder DNA, die Verwendung dieses Verfahrens zur in-vitro Diagnose von Krebs und die  
10 Verwendung erfindungsgemäß charakterisierter Krebszellen zum Testen von Wirkstoffen auf antineoplastische Wirkung sowie Mittel zur Durchführung des Verfahrens.

Die Diagnose von Krebs beim Menschen stellt nach wie vor eine  
15 der größten Herausforderungen der heutigen Medizin dar. Gängige Diagnoseverfahren erlauben die Erkennung von krebsartigen Geschwülsten, die im folgenden umfassend als Tumore (Sarkome, Karzinome, systemisch-hämatologische Malignome) bezeichnet werden sollen, häufig erst dann, wenn  
20 der Tumor schon ein fortgeschrittenes Stadium erreicht hat. Trotz erheblicher Fortschritte bei bildgebenden Verfahren setzt deren erfolgreiche Anwendung immer eine gewisse Mindestgröße des Tumors voraus. Zudem läßt sich mit derartigen Verfahren - wenn überhaupt - nur sehr wenig weiterführende  
25 Information über die Art und Beschaffenheit des Tumors gewinnen. Die zeitaufwendigen und kostenintensiven bildgebenden Verfahren dienen daher in der Regel lediglich als Orientierungshilfen für das weitere, häufig direkte Vorgehen, in der Regel eine Gewebeentnahme. Letztere Maßnahme bedeutet  
30 aber einen invasiven Eingriff in den Körper des Patienten, der je nach Lage und Beschaffenheit des Tumors für den Patienten sehr unangenehm oder sogar gefährlich sein kann.

Wird anhand einer solchen Gewebeentnahme ein Tumor diagnosti-  
35 ziert, folgen normalerweise weitere Untersuchungen, die beispielsweise das Streuungspotential, d.h. die Metastasenbildung, dieses Tumors beschreiben sollen. Wird z.B.

Brustkrebs diagnostiziert, entnimmt man der betroffenen Patientin in der Regel 20 bis 30 Lymphknoten und bestimmt die Anzahl der Lymphknoten, die Krebszellen aufweisen. Die herrschende Meinung geht davon aus, daß die Überlebenschance einer Patientin mit zunehmender Anzahl befallener Lymphknoten abnimmt. Neuere Erkenntnisse deuten allerdings an, daß das Auftreten solcher Lymphknoten-Metastasen eher ein Maß für das Alter als für die Aggressivität oder das Metastasierungspotential des Tumors ist.

10 Im Zuge der fortschreitenden Entwicklung molekularbiologischer Methoden und dem zunehmenden Wissen über die genetischen Hintergründe der Zellentartung hat man in den letzten Jahren neue Wege beschritten, Krebs zu  
15 diagnostizieren. Man ging davon aus, daß Krebszellen charakteristische Marker exprimieren, aufgrund derer sie von nichtentarteten Zellen zu unterscheiden und somit als Krebszellen zu identifizieren sein sollten. Mit der Entwicklung der Hybridomtechnik und der dadurch ermöglichten  
20 Züchtung monoklonaler Antikörper wurde eine Vielzahl von Immunoassays entworfen, die durch den Nachweis bestimmter Marker zur Diagnose von Krebs beitragen sollen. Beispiele für solche Marker sind das karzinoembryonale Antigen (CEA), das  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP) oder das prostata-spezifische Antigen  
25 (PSA). In der EP 0 747 705 wurde kürzlich vorgeschlagen, nur die 90 kDa-Glycoform einer zu CEA strukturell verwandten Gruppe von Proteinen (NCAs) im Blut zu untersuchen, da scheinbar nur diese Glycoform in den Blutstrom abgegeben wird. Die WO 96/21862 gibt an, daß die Messung der  
30 Konzentration an A-Protein im Blut die Diagnose von Krebs gestatten würde, stellt aber auch fest, daß die Hoffnungen, die in bis dahin untersuchte Marker, wie CEA, AFP oder PSA gesetzt wurden, nicht erfüllt worden sind. Weitere auf dem immunologischen Nachweis bestimmter Proteine beruhende  
35 Verfahren werden beispielsweise in DE 195 00 723; WO 97/26271; WO 97/28186; WO 96/01907; US 5,633,142; US 5,620,848; US 5,589,579; und US 5,563,247 beschrieben. Eine verlässliche Diagnose von Krebs scheint allerdings auf diese

Art zumindest zur Zeit nicht möglich zu sein.

Andere Forscherteams haben sich dagegen auf die Analyse des genetischen Materials von Krebszellen konzentriert. So schlägt  
5 die WO 93/04200 vor, zur Abschätzung einer Veranlagung für Brustkrebs DNA aus einer Blutprobe der Patientin zu isolieren, diese DNA auf bestimmte Weise zu restringieren und aufgrund des Restriktionsmusters eine entsprechende Diagnose zu stellen. Ein Nachweis von Tumorzellen im Blut ist mit  
10 dieser Methode allerdings nicht möglich.

Die WO 96/02671 beschreibt darüber hinaus ein Verfahren, mit dem man genomische DNA oder cDNA aus neoplastischem Gewebe, Blut oder einer anderen Körperflüssigkeit allein durch  
15 Sequenzanalyse (Sequenzierung oder Hybridisierung) auf Mutationen eines Gens untersucht, welches für ein Protein kodiert, dessen Funktionsstörung mit Krebs in Zusammenhang gebracht wird. Über ähnliche Ansätze wird in WO 97/26271; WO 97/28186; WO 96/15262; WO 96/01907; WO 93/22456; US  
20 5,620,848; US 5,149,628 und WO 96/21021 berichtet.

Vielfach wird auch vorgeschlagen, die im Blutplasma frei vorhandene DNA und/oder RNA auf onkogene Mutationen oder Deletionen, Tumorsuppressor-Gen-Mutationen oder -Deletionen  
25 oder Veränderungen des Mikrosatellitenmusters zu untersuchen (vergleiche beispielsweise WO 95/16792; DE 37 21 400; DE 37 17 212; und WO 93/22456).

Schließlich beschreibt auch die WO 94/10343 ein Verfahren zur  
30 Diagnose von Krebs, nämlich zur Erkennung von Prostatakrebs-Mikrometastasen, wobei man das Blut eines Patienten auf RNA untersucht, die für das prostataspezifische Antigen kodiert. Allerdings werden bei diesem Verfahren in etwa zwei Dritteln der Fälle sogenannte falsch-positive Antworten erhalten, da  
35 auch Entzündungen oder Verletzungen der Prostata Drüse die Konzentration des Proteins im Blut erhöhen. Andererseits bleiben aufgrund von Unzulänglichkeiten des Tests vermutlich 30 % der Krebserkrankungen nach wie vor unentdeckt. Eine

ähnliche Vorgehensweise wird in US 5,601,990 zur Diagnose von metastasierendem Darmkrebs gewählt.

5 Zusammenfassend läßt sich daher feststellen, daß der Stand der Technik keine zuverlässige Diagnose von Krebs zuläßt.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein in-vitro Verfahren zu schaffen, mit dem alle Krebsformen von Säugern und insbesondere von Menschen zuverlässig und  
10 hinreichend genau, auch für einzelne Patienten, erkannt und beurteilt werden können, und das es ermöglicht, den Verlauf einer geeigneten Krebstherapie zu verfolgen. Das Verfahren soll außerdem das Testen von Wirkstoffen auf antineoplastische Wirkung ermöglichen.

15 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Charakterisierung disseminierter und mikrometastasierter Krebszellen anhand von DNA und/oder RNA gelöst, wobei man aus Körperflüssigkeit eines Individuums gewonnene Zellen  
20 anhand von mRNA auf wenigstens ein krebsspezifisches Gen untersucht; und/oder aus Körperflüssigkeit eines Individuums abgetrennte Krebszellen anhand von DNA und/oder mRNA auf wenigstens ein krebsspezifisches Gen untersucht und die gleiche Untersuchung  
25 mit Nichtkrebszellen desselben Individuums zum Vergleich durchführt.

Unter Charakterisierung werden erfindungsgemäß alle jene Maßnahmen verstanden, die an Zellen von Säugern und  
30 insbesondere von Menschen durchgeführt werden können, um ein, zwei, drei, vier, fünf, 6 bis 10, 11 bis 20 oder mehr krebsspezifische und/oder krebsassoziierte Gene dieser Zellen qualitativ oder quantitativ zu erfassen. Aufgrund der durch die Charakterisierung gewonnenen Ergebnisse kann dann die  
35 Identifizierung der Zellen vorgenommen werden. Dies umfaßt erfindungsgemäß nicht nur den qualitativen Nachweis von zirkulierenden Krebszellen, sondern kann auch deren Quantifizierung und/oder Angaben über deren Herkunft und

Verhalten, beispielsweise bezüglich der Metastasenbildung oder bei verschiedensten, beispielsweise cytotoxischen Therapieansätzen beinhalten.

- 5 Zu zirkulierenden Krebszellen gehören erfindungsgemäß vor allem solche Krebszellen, die sich vom Primärtumor abgelöst haben, d.h. disseminierte und mikrometastasierte Krebszellen. Im folgenden wird zwecks Vereinfachung von zirkulierenden Krebszellen gesprochen. Da die Streuung dieser Zellen in der
- 10 Regel mit der Vaskularisierung des Primärtumors zusammenhängt, kann man zirkulierende Krebszellen insbesondere im Blut auffinden, wobei auch Knochenmark und Lymphknoten geeignet sind. Dementsprechend werden erfindungsgemäß Körperflüssigkeiten, wie Blut, Lymphe, Urin, Knochenmark und
- 15 verschiedene Organspülflüssigkeiten wie Bronchiallavage, Pankreas- oder Blasenspülflüssigkeit untersucht.

- Erfindungsgemäß wird zwischen krebsspezifischen und krebssassoziierten Genen unterschieden. Krebspezifisch im
- 20 erfindungsgemäßen Sinn sind solche Gene, anhand derer sich eine zirkulierende Krebszelle als solche erkennen läßt. Krebsassoziierte Gene dagegen sind nicht spezifisch für Krebszellen. Sie können auch in gesunden Zellen oder bei einer Vielzahl verschiedener anderer Erkrankungen,
- 25 beispielsweise Entzündungen, exprimiert werden. Allerdings kann deren Expression in Krebszellen im Vergleich zu Nichtkrebszellen charakteristisch moduliert sein, so daß weitere Rückschlüsse auf die Art und das Verhalten der Krebszellen möglich sind.

- 30 In diesem Sinn ist es natürlich auch möglich, daß ein bestimmtes Gen sowohl zur krebsspezifischen als auch krebssassoziierten Charakterisierung beitragen kann. Beispielsweise kann ein Gen eine Mutation aufweisen, die zur
- 35 anomalen Expression eines zellzyklus-regulierenden Proteins und infolgedessen zur Entartung der betroffenen Zelle führt. Dieses mutierte Gen ist daher krebsspezifisch und die

- erfindungsgemäße Untersuchung auf den Nachweis dieses mutierten Gens dient zur krebsspezifischen Charakterisierung. Darüber hinaus kann eine Analyse der anomalen Expression dieses Gens auch zur krebsassoziierten Charakterisierung
- 5 beitragen, da die Art oder Menge entsprechender Expressionsprodukte für den Zellzyklus von Bedeutung sind und dadurch weitere Rückschlüsse auf die Art und das Verhalten der Krebszellen möglich sind.
- 10 Die Untersuchung auf krebsspezifische und krebsassoziierte Gene kann auf jede dem Fachmann erdenkliche Art und Weise vorgenommen werden. So kann ein erfindungsgemäßes Gen auf DNA-Ebene, auf RNA-Ebene und/oder auf Proteinebene untersucht werden. Auf DNA-Ebene untersucht man vorzugsweise genomische
- 15 DNA auf Mutationen, Amplifikationen, LOH's, Translokationen und/oder Polymorphismen. Auf RNA-Ebene und auf Proteinebene untersucht man Expressionsprodukte, nämlich vorzugsweise Transkriptionsprodukte wie mRNA bzw. Translationsprodukte wie Proteine. Bevorzugt sind Methoden, mit deren Hilfe die
- 20 Beteiligung eines Gens am Zustand zirkulierender Zellen zum Untersuchungszeitpunkt bewertet werden kann, z.B. die Untersuchung von mRNA insbesondere im Hinblick auf die in einer Zelle vorhandene Menge an einer bestimmten mRNA. Beinhaltet das erfindungsgemäße Verfahren eine Untersuchung
- 25 einer Körperflüssigkeit auf Proteine, so handelt es sich insbesondere um diejenigen, die von den krebsspezifischen und/oder krebsassoziierten Genen exprimiert werden. Im folgenden wird, sofern nichts anderes angegeben ist, umfassend von einer Untersuchung oder Analyse der
- 30 erfindungsgemäßen Gene gesprochen.

Die in der nachfolgenden Beschreibung aufgeführten spezifischen Gene werden häufig mit Abkürzungen oder Codes bezeichnet, die üblicherweise verwendet werden und dem

35 Fachmann deshalb bekannt sind. Darüber hinaus kann das am Ende der vorliegenden Beschreibung eingefügte Glossar zur Erläuterung herangezogen werden.



Zu den erfindungsgemäßen krebsspezifischen Genen zählen insbesondere zwei Klassen von Genen, die bei der Krebsentstehung eine wesentliche Rolle spielen: Onkogene, die durch Mutation aus sogenannten Proto-Onkogenen entstehen und mutierte Tumorsuppressor-Gene. Beide dirigieren in ihrer normalen Form den Lebenszyklus einer Zelle: Proto-Onkogene fördern das Zellwachstum, Tumorsuppressor-Gene bremsen es. Onkogene sind krebsbegünstigend, da sie die Zelle zu übermäßiger Vermehrung anregen, während Tumorsuppressor-Gene dann zur Krebsentstehung beitragen, wenn sie durch Mutation inaktiviert werden und die Zelle infolgedessen eine Wachstumsbremse verliert, durch die sie normalerweise an einer unangemessenen Vermehrung gehindert wird. Onkogene kodieren beispielsweise für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, Signalproteine, Transkriptionsfaktoren und eine Vielzahl anderer Proteine, von denen einige beispielsweise bei der Apoptose eine wichtige Rolle spielen. Zu den Onkogenen zählen beispielsweise Gene, wie die bcl-2-Familie, mdm2, c-abl, die myc-Familie, beispielsweise c-, N-, R-, L- und B-myc, die ras-Familie, beispielsweise H-, K- und N-ras, erb-B2, das auch neu genannt wird, erb-B, PDGF, RET und virale Onkogene verschiedener Tumerviren, wie Papova-Viren, beispielsweise SV40-, Polyoma- und Papilloma-Viren, wie HPV, Adenoviren, bestimmte Herpesviren, Pockenviren, Hepatitis-B-Viren (HBx-Gen), Hepatitis-C-Viren, HTLV-1, E1A-Fusionstranskript bei Adeno-viren, E6- und E7-Fusionstranskripte bei HPV und EBV beim Burkitt-Lymphom.

Erfindungsgemäß bevorzugte Onkogene sind Gene der ras-Familie, erb-B2, erb-B, c-myc, mdm2, bcl-2, Hepatitis-B-Viren (HBx-Gen), Hepatitis-C-Viren, HTLV1, E1A-Fusionstranskript bei Adenoviren, E6- und E7-Fusionstranskripte bei HPV und EBV beim Burkitt-Lymphom. Ganz besonders bevorzugt sind c-myc, k-ras und erb-B2.

35

Zu den Tumorsuppressor-Genen zählen beispielsweise die Gene der APC-Familie (FAP), DCC, DPC4, NF-1, NF-2, MTS1, RB, p53, WT1, BRCA1, BRCA2, VHL, MSH2, MLH1 und WAF1.

Erfindungsgemäß bevorzugte Tumorsuppressor-Gene sind p53, RB, APC, DCC, BRCA1, BRCA2, MSH2, MLH1 und WAF1. Ganz besonders bevorzugt sind p53, RB, APC, DCC und DPC4.

- 5 Zu den krebsspezifischen Genen zählen auch die neben Onkogenen und mutierten Tumorsuppressor-Genen auch Gene, die bei Nichtkrebszellen in erfindungsgemäß untersuchten Körperflüssigkeiten abgeschaltet sind, d.h. nicht oder nur in unwesentlichen Mengen exprimiert werden. Werden daher
- 10 Transkriptions- und/oder Translationsprodukte dieser Gene in einer Körperflüssigkeit, beispielsweise Blut, nachgewiesen, spricht dies für das Vorliegen zirkulierender Krebszellen in der betreffenden Körperflüssigkeit.
- 15 Hierzu zählen beispielsweise hCG, hTG, Calcitonin, Albumin, Surfactant-Proteine, Telomerase, verschiedene Translokationen, Stat5a, Varianten von Steroidrezeptoren (ÖR, AR), Progesteron-Rezeptor, verschiedene Gene, die ein LOH aufzeigen, CEA, PSM, PSA, AFP, Tyrosinase, MAGE3, Muc18,
- 20 MUC1, Cytokeratine, insbesondere CK20 und CK19, LOH-Untersuchungen in verschiedenen Chromosomenabschnitten durch zahlreiche Mikrosatelliten, Magen-Darm-Trakt-Hormone, wie Motilin, Enteroglucagon, GIP, Gastrin, CCK oder PYY, und Neurotensin. Erfindungsgemäß bevorzugt sind CEA, PSM, MUC1
- 25 (tumorspezifische Splice-Variante), AFP, Cytokeratin, Tyrosinase, MAGE3, MUC18, tumorspezifische Splice-Varianten des Östrogen- und Androgen-Rezeptors, und EGP.

- Zu derartigen Genen zählen auch die unten aufgeführten
- 30 gewebsspezifischen Gene, die aufgrund ihrer Gewebsspezifität zur erfindungsgemäßen krebsassoziierten Charakterisierung beitragen, aber durch die Eigenart des Untersuchungsobjektes, nämlich in einer Körperflüssigkeit zirkulierender, vom Primärtumor losgelöster Krebszellen, auch zur krebsspezifischen
- 35 Charakterisierung herangezogen werden können.

Darüber hinaus können auch prognostische Onkoproteine, wie anti-p53, pan p53, p53 oder c-erb-B2, zur krebsspezifischen

Untersuchung herangezogen werden.

- Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung untersucht man eine Körperflüssigkeit auf
- 5 wenigstens ein krebspezifisches Gen und wenigstens ein krebsassoziiertes Gen. Dazu untersucht man aus Körperflüssigkeit eines Individuums gewonnene Zellen zusätzlich auf wenigstens ein krebsassoziiertes Gen, das bei Nichtkrebszellen der untersuchten Körperflüssigkeit im
- 10 wesentlichen nicht exprimiert wird; und/oder untersucht man aus Körperflüssigkeit eines Individuums abgetrennte Krebszellen zusätzlich auf wenigstens ein krebsassoziiertes Gen und führt die gleiche Untersuchung mit Nichtkrebszellen desselben Individuums zum Vergleich durch.
- 15 Die erfindungsgemäßen krebsassoziierten Gene umfassen ein breites Funktionsspektrum. Insbesondere geeignet sind gewebsspezifische, d.h. organotypische Gene (Morphogene), die Aussagen über die Herkunft der zirkulierenden Krebszellen
- 20 zulassen, so daß auf die Lokalisation des Primärtumors, der Streuquelle, geschlossen werden kann; Gene, welche die Metastasierungsfähigkeit der Krebszellen kennzeichnen; Gene, die für Steroidhormonrezeptoren kodieren, so daß Aussagen über den Rezeptorstatus der Krebszellen möglich sind;
- 25 Chemoresistenz-Gene; oder Gene, deren Expression mit der Modulierung der Immunantwort sowie der Zellproliferation und Apoptose zirkulierender Krebszellen korreliert. Die Expression dieser krebsassoziierten Gene kann bei Krebszellen in charakteristischer Weise moduliert sein, so daß das
- 30 resultierende Expressionsmuster auch einen Hinweis auf Krebs geben kann.

- Krebsassoziierte gewebsspezifische Gene kodieren häufig für organotypische Marker, also Proteine bzw. Antigene, aufgrund
- 35 derer sich auf die Herkunft der das Gen exprimierenden Zelle schließen läßt. Hierzu zählen beispielsweise Leber-spezifische Gene, wie Albumin oder AFP; Prostata-spezifische, wie AR, PSM, hK2 oder PSA; Mamma-, Ovar- und/oder Cervix-

- spezifische, wie  $\beta$ -hCG, ÖR, PR, SCCA-1, Maspin oder BA46; Colorectal-spezifische, wie CCK, Enteroglucagon, GIP, Gastrin, Motilin oder PYY; Pankreas-spezifische wie PYY; Melanom-spezifische, wie MAGE1, MAGE3, Muc18 oder Tyrosinase;
- 5 Schilddrüsen-spezifische, wie hTG; Lungen-spezifische, wie SF, SF-R, Surfactant-Proteine, beispielsweise SP-A und SP-C, CC10, N-CoR oder RARB2; Blasen-spezifische, wie EGF-R und  $\beta$ -hCG; Endometrium-spezifische wie SCCA.
- 10 Zur gewebspezifischen Charakterisierung kann auch auf Onkogene und/oder mutierte Tumorsuppressor-Gene zurückgegriffen werden, wenn sie auf bestimmte Formen von Krebs hinweisen. Beispiele hierfür sind tumorassoziierte Mutationen, wie Translokation 14;18 (bcl-2) für Lymphome,
- 15 Translokation 9;22 (BCR/ABL) für chronische myeloische Leukämien, Translokation 15;17 für akute nichtlymphozytäre Leukämien, Translokation 2;13 (PAX3-FKHR) und Translokation 1;13 (PAX7-FKHR) für alveolare Rhabdomyosarkome, Translokation 11;22 für Ewing Sarkome, Translokation 12;16
- 20 für myoxoide Liposarkome, Translokation x;18 für Synovialsarkome; BRCA-1 und BRCA-2 für Mammakarzinome, DPC-4 für Pankreaskarzinome, erb-B für Glioblastome, MLH-1 und MSH-2 für HNPCC (hereditary nonpolyposis colon cancer), NF-2 für Neurofibromatose-1, NF-1 für Neurofibromatose, RET für
- 25 Schilddrüsenkarzinome, RB für Retinoblastome, VHL für Nierenkarzinome, WT-1 für Nieren-tumoren, und k-ras für Colonkarzinome.

- Die Charakterisierung der Metastasierungsfähigkeit zirkulierender Krebszellen nimmt erfindungsgemäß eine besondere
- 30 Stellung ein. Zu diesem Zweck werden die Zellen insbesondere auf Gene untersucht, die für Angiogenese-, Wachstums- und Motilitätsfaktoren, Matrixdegradationsfaktoren, wie Proteasen und deren Hemmstoffe, oder Adhäsionsfaktoren, wie Adhaerine,
- 35 kodieren.

Zu den Angiogenesefaktoren zählen beispielsweise aFGF und bFGF sowie deren Rezeptoren aFGF-R und bFGF-R, VEGF und

dessen Rezeptoren VEGF-R1 und VEGF-R2, sowie GD-AIF.

Zu den Wachstumsfaktoren zählen beispielsweise TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ , IGF, IGF-BP3, erb-B (EGF-R), PDGF und EGF.

5

Zu den migrationstimulierenden Motilitätsfaktoren zählen beispielsweise der Scatter-Faktor SF-L und dessen Rezeptor SF-R (c-met).

- 10 Die Proteasen und deren Hemmstoffe umfassen beispielsweise Matrix-Hydrolasen, wie MMP's (Matrix-Metalloproteasen), MT-MMP, UPA (Urokinase-artiger Plasminogenaktivator) oder deren Inhibitoren, wie PAI1 und PAI2 (Plasminogenaktivator-Inhibitor) oder TIMP's (Gewebeinhibitoren von Metalloproteasen).

15

Zu den Adhaerinen zählen Adhäsionsproteine, wie Cadhaerine, beispielsweise E-Cadhaerin, Catenine, beispielsweise  $\beta$ -Catenin, Selectine, beispielsweise E-, P- und L-Selectin sowie deren Rezeptoren, CD44 (Standard- und Splice-Varianten), Integrine und ICAM's.

20

Erfindungsgemäß bevorzugte Gene zur Charakterisierung der Metastasierungsfähigkeit sind Angiogenesefaktoren (bFGF und bFGF-R; VEGF und VEGF-R's), Proteasen (UPA; PAI; MMP's; TIMP's), Adhaerine (E-Cadherin;  $\alpha$ -Catenin;  $\beta$ -Catenin; Selectin-L und -R; CD44), Motilitätsfaktoren SF-L und c-met und Metastasen-Suppressor nm23.

25

- 30 Von den Steroidhormonrezeptor-Genen kommen erfindungsgemäß bevorzugt die Gene zur Anwendung, die für den Östrogen-, Progesteron- oder Androgen-Rezeptor (ÖR, PR oder AR) kodieren.

- Auch die Charakterisierung von Chemoresistenz-Genen zirkulierender Krebszellen ist erfindungsgemäß von besonderer Bedeutung, da Krebszellen häufig gegen Therapeutika, zum Teil auch mehrfach, resistent sind und eine Charakterisierung dieser Gene zur Bewertung der Erfolgchancen bestimmter

35

Krebstherapien beitragen kann. Beispiel für solche Chemoresistenz-Gene sind MDR1, das für das P-Glykoprotein kodiert, nm23, hMLH1, gp170, MRP1, das Topoisomerase-Gen, das Glutathion-S-Transferase-pi-Gen, das LRP-Gen und Gene, die  
5 für  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Tubulin kodieren.

Erfindungsgemäß bevorzugt untersuchte Chemoresistenz-Gene sind MDR1, MRP1, das Topoisomerase II-Gen, das LRP-Gen, das  $\beta$ -Tubulin-Gen und das Glutathion-S-Transferase-pi-Gen.

10

Zur Charakterisierung einer Modulierung der Immunantwort kann man sich beispielsweise der Bewertung der T- und NK-zellvermittelten Cytotoxizität und/oder antikörperabhängigen zellvermittelten Cytotoxizität (ADCC) bedienen. Zu diesem Zweck  
15 kann man immunologische Effektorzellen, insbesondere NK-, H1/TH2- und CD8-Zellen auf der einen Seite und zirkulierende Krebszellen auf der anderen Seite beispielsweise auf das TNF- $\alpha$ -Gen (Tumornekrose-Faktor), Gene, die für Interferone, beispielsweise  $\alpha$ - und  $\gamma$ -IFN kodieren, FAS-Liganden- und FAS-Rezeptoren-Gene, Perforin1, bcl-2, bax und Granzyme  
20 untersuchen. Bevorzugt sind FAS-R und FAS-L, Perforin und Granzyme.

Die Proliferations- und Apoptoseeigenschaften zirkulierender  
25 Krebszellen werden erfindungsgemäß anhand von Genen untersucht, die mit dem Proliferations- und Apoptosestatus von Zellen, insbesondere von Krebszellen, korrelieren. Dazu zählen unter anderen auch einige der oben genannten Onkogene bzw. Proto-Onkogene und Tumorsuppressor- bzw. mutierten  
30 Tumorsuppressor-Gene, die - über die krebsspezifische Charakterisierung hinaus - aufgrund ihres Expressionsmusters auch zur krebsassoziierten Charakterisierung beitragen können. Erfindungsgemäß wird beispielsweise auf p53, durch p53 sequenzspezifisch transkriptional aktivierte (Bax; FAS-L und -R; Cyclin A, B1, D1, D2, D3, E oder G; GADD45; GD-AIF; HIC1; IGF-BP3; mdm2; p21) und inaktivierte Gene (bcl-2; c-myc; bFGF, c-fos; HSP70; IL-6; MDR1; PCNA), zu Beginn der Apoptose und des Zellzyklusarrestes exprimierte Gene (außer  
35

p53 noch TNF- $\alpha$ , TNF-R1, TNF-R2, DPC-4, IFN- $\gamma$  und FAS-L und -R) sowie Gene, die bei unreguliertem Wachstum vorkommen, wie erb-B2, EGF und sonstige autokrine Wachstumsfaktoren (TGF- $\alpha$ ; PDGF) zurückgegriffen. Bevorzugt sind Bax, FAS, Cycline, 5 mdm2, p21, p16, bcl-2, c-myc, FGF, MDR1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , erb-B2, EGF und sonstige autokrine Wachstumsfaktoren.

Zur tumorbiologischen Untersuchung, d.h. zur Charakterisierung einer Modulierung der Immunantwort, der 10 Proliferations- und Apoptoseeigenschaften, werden Cycline, insbesondere die Cycline B1, D1 und E, Ki67, FAS-L, FAS-R, bax und/oder bcl-2 bevorzugt untersucht.

Die Untersuchung einer Körperflüssigkeit kann durch Anwendung 15 bekannter immunologischer Verfahren vorgenommen werden. Hierzu zählen beispielsweise Immunopräzipitations- und Kompetitionsexperimente, Immunofluoreszenz, immunohistochemische Färbeverfahren, Western-Blotting, Durchflußcytometrie, ELISA u.ä. sowie massenspektrometrische 20 Verfahren. Da immunologische Verfahren in der Regel auf bestimmte Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen abstellen, dienen solche Verfahren vorzugsweise zur Untersuchung der Körperflüssigkeit auf Proteine, wobei es sich insbesondere um Proteine handelt, die von den vorstehend beschriebenen Genen 25 exprimiert werden. Zu diesem Zweck eventuell benötigte Antikörper sind dem Fachmann entweder bekannt oder können nach üblichen Verfahren erhalten werden. Erfindungsgemäß werden immunologische Verfahren bevorzugt zur Untersuchung von Blut und insbesondere von Knochenmark eingesetzt. Mit 30 immunologischen Verfahren lassen sich vorteilhafterweise z.B. folgende Proteine analysieren: P53, ERB-B2 und Tumorantigene mittels ELISA und ähnlicher Verfahren; FAS-Ligand und FAS-Rezeptor, Phosphatidylserin, Cytokine, Perforin, Cytokeratine und Cycline mit Hilfe von Immunphänotypisierung.

35 Eine bevorzugte Möglichkeit zur erfindungsgemäßen Untersuchung von Körperflüssigkeiten bietet die Nukleinsäureanalyse. Hierzu gehören beispielsweise

Untersuchungen von DNA oder RNA, insbesondere mRNA, mit Hilfe von Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, wie Sequenzierungstechniken, Hybridisierungs-techniken, beispielsweise Northern- oder Southern-Blotting, 5 Hybridisierung auf Microchips, insbesondere Verfahren, die auf der Polymerasekettenreaktion (PCR) beruhen und auch Techniken, bei denen die zu untersuchende DNA oder RNA zunächst in-vitro transkribiert und/oder translatiert wird. Erfindungsgemäß kann jede Körperflüssigkeit mit Hilfe einer 10 Nukleinsäureanalyse untersucht werden. Vorteilhafterweise greift man auf Blut zurück, insbesondere dann, wenn mRNA untersucht wird. Zur Untersuchung eines Gens kann natürlich auch eine Kombination aus unterschiedlichen Nukleinsäureanalysen eingesetzt werden. Auch eine Kombination aus 15 immunologischen Verfahren und Nukleinsäureanalysen kann von Vorteil sein.

Viele der krebsspezifischen und krebsassoziierten Gene werden vorzugsweise anhand von mRNA untersucht. Eine zu diesem Zweck 20 angewandte Technik ist die direkte Hybridisierung von mRNA und/oder cDNA (qualitativ/quantitativ) auf einer soliden Matrix (z.B. in Form von Microchips) mit immobilisierten Oligonucleotiden bzw. immobilisiertem Streptavidin und biotinylierten Oligonukleotiden. Auf diese werden mRNA, cDNA 25 oder doppelsträngige PCR-Produkte hybridisiert. Für die Einführung des Signals stehen verschiedene Wege zur Verfügung, z.B. Primerextension durch markierte dNTP und ddNTP. Entsprechend der Markierung wird das Detektions-Prinzip gewählt: Radioaktivität, Fluoreszenz, Chemi- 30 lumineszenz oder weitere dem Fachmann zu diesem Zweck bekannte Methoden.

Insbesondere bedient man sich einer bekannten Technik, welche die reverse Transkription (RT) und die Polymeraseketten- 35 reaktion (PCR) kombiniert und im folgenden als RT-PCR bezeichnet wird. Bei diesem Verfahren wird zunächst die mRNA aus den Zellen einer erfindungsgemäßen Körperflüssigkeit isoliert. Diese wird dann mit Hilfe der reversen



Transkriptase zu cDNA umgeschrieben, welche in Folge mit Hilfe der PCR amplifiziert wird. Die so erhaltenen PCR-Produkte können dann entweder einer Fragmentanalyse, ggf. nach geeigneter Aufreinigung, zugeführt, direkt oder indirekt über weitere Klonierungszyklen sequenziert oder auch in-vitro exprimiert werden. Die Quantifizierung der untersuchten mRNA's erfolgt über verschiedene interne Kontrollen, vorzugsweise in Form von Zelläquivalenten oder klonierten cDNA's bzw. cRNA's durch fluoreszenzmarkierte Primer, durch "real-time"-PCR oder durch RNA-Hybridisierung auf Microchips. Die zellspezifische Quantifizierung von Genen erfolgt über interne Standards, insbesondere vom Zelltyp unabhängige RNA (cDNA), die z.B. für GAPDH,  $\beta$ -Mikroglobulin, L32 oder  $\beta$ -Actin kodiert. Die Spezifität wird durch umfangreiche Kontrollen abgesichert, wie Mismatch-Proben oder die Sequenzierung der cDNA.

Bei den krebsspezifischen Genen, die bevorzugt anhand von mRNA-Analysen an Körperflüssigkeiten charakterisiert werden, handelt es sich insbesondere um die oben beschriebenen Gene, die bei Nichtkrebszellen in der untersuchten Körperflüssigkeit im wesentlichen nicht exprimiert werden.

Krebsassoziierte Gene werden in der Regel bevorzugt anhand von mRNA-Analysen an Körperflüssigkeiten charakterisiert. Hierzu zählen insbesondere folgende Gene: bFGF, bFGF-R, VEGF, VEGF-R's, MMP's, TIMP's, MDR1, MRP, LRP, Topoisomerase II, Gluta-thion-S-Transferase, Progesteron-Rezeptor, Bax, bcl-2, FAS-L, FAS-R, mdm2, p21, p16, c-myc, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , erb-B2 und EGF.

Eine DNA-Analyse, insbesondere die Sequenzanalyse genomischer DNA, ist in der Regel für die Untersuchung auf Onkogene und/oder mutierte Tumorsuppressor-Gene bevorzugt und kann insbesondere bei der Charakterisierung folgender Gene von Vorteil sein: p53, ras-Familie, erb-B2, c-myc, mdm2, BRCA1, BRCA2, APC, DCC, RB MSH2, MLH1, RET und LOH-Untersuchungen in verschiedenen Chromosomenabschnitten durch zahlreiche

Mikrosatelliten.

- Körperflüssigkeiten können in dem Zustand analysiert werden, in dem sie gewonnen wurden. Allerdings werden die Proben, 5 erfindungsgemäß in der Regel zunächst durch in an sich bekannte Maßnahmen auf die nachfolgende Untersuchung vorbereitet, indem Zellen bzw. zellhaltige Konzentrate oder zellhaltige Flüssigkeiten aus der Körperflüssigkeit gewonnen werden. Dies gilt insbesondere für die Nukleinsäureanalysen. 10 So können beispielsweise anstelle von Blut bestimmte davon abgeleitete zellhaltige Flüssigkeiten oder Zellkonzentrate, beispielsweise der sogenannte Buffy-Coat oder Zellfraktionen nach Dichtezentrifugation, vorteilhafterweise verwendet werden. Die aus Körperflüssigkeit gewonnenen Zellen können 15 dann insbesondere auf solche Gene untersucht werden, die bei Nichtkrebszellen der untersuchten Körperflüssigkeit im wesentlichen nicht exprimiert werden.

- Bei der Untersuchung auf Gene, die auch von Nichtkrebszellen 20 in der untersuchten Körperflüssigkeit exprimiert werden oder bei Untersuchungen auf genomische DNA untersucht man erfindungsgemäß in der Regel aus der Körperflüssigkeit abgetrennte Krebszellen.
- 25 Zur Abtrennung von Krebszellen können bekannte Verfahren eingesetzt werden, beispielsweise physikalische Verfahren wie Mikro-Filtration oder Dichtegradientenzentrifugation, oder antigenspezifische Immunadsorptionsverfahren, bei denen spezifische Antikörper die Krebszellen derart markieren, daß 30 sie anschließend aussortiert werden können. Geeignete Antikörper (z.B. anti-EGP) sind beispielsweise mit fluoreszierenden und insbesondere magnetischen Markern versehen, so daß bei Verwendung eines derart markierten krebszellspezifischen Antikörpers Krebszellen nach Bindung solcher 35 Antikörper in sogenannten Zellsortern isoliert werden können. Zur Auswahl geeigneter Antikörper zu Isolierzwecken bestimmter Krebszellen kann man auf die Charakterisierung und Identifizierung dieser Krebszellen ohne vorherige Isolierung

zurückgreifen. Vorzugsweise werden die Krebszellen in lebensfähigem und insbesondere vermehrungsfähigem Zustand isoliert. Insbesondere die mRNA sollte für die oben beschriebenen Untersuchungen intakt sein.

5

Die nach einer Separation erhaltenen Zellfraktionen müssen dann gegen Zelltyp-unabhängige Marker (beispielsweise GAPDH,  $\beta$ 2-Mikroglobulin, L32 oder  $\beta$ -Actin) quantifiziert werden. Ein weiterer Reinheitsnachweis kann durch RNA erfolgen, die für

10 MNCs (mononukleäre Zellen) spezifisch ist (Perforin, CD45). Die nach Separation erhaltenen verschiedenen Zellfraktionen (Fraktion A: MNC einschließlich der Tumorzellen; Fraktion B: MNC nach der Entfernung der Tumorzellen; Fraktion C: aufgereinigte Tumorzellen) werden dann auch miteinander

15 verglichen, indem man die abgetrennten Krebszellen untersucht und die gleiche Untersuchung mit Nichtkrebszellen desselben Individuums zum Vergleich durchführt. Dadurch werden patienteneigene Kontrollen in die Untersuchung miteinbezogen.

20

Gemäß einer besonderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung trennt man einzelne Krebszellen aus der Körperflüssigkeit ab und untersucht diese auch einzeln. Zu diesem Zweck kann durch eine sogenannte Einzelzell-PCR durch

25 Genomamplifikation ein verändertes Genom einer einzelnen entarteten Zelle analysiert werden.

Die Isolierung zirkulierender Krebszellen wird vorteilhafterweise für genomische Untersuchungen und die Untersuchung auf

30 Gene durchgeführt, die auch von Nichtkrebszellen in der untersuchten Körperflüssigkeit exprimiert werden, z.B. folgenden Genen:

DNA: p53, ras-Familie, erb-B2, c-myc, mdm2, RB, APC, DCC, LOH-Untersuchungen in verschiedenen Chromosomenabschnitten

35 durch zahlreiche Mikrosatelliten:

RNA: bFGF, bFGF-R, VEGF-R's, MMP's, TIMP's, MDR1, MRP, LRP, Topoisomerase, Glutathion-S-Transferase, Bax, bcl-2, FAS, mdm2, p21, p16, c-myc, FGF, MDR1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und EGF, AR,

ÖR, EGP und SF.

- Bestimmte erfindungsgemäße Untersuchungen werden bevorzugt an Zellkulturen vorgenommen. Dazu kann man die zirkulierenden Krebszellen in der oben beschriebenen Weise isolieren und anschließend unter geeigneten Bedingungen kultivieren. Insbesondere Aussagen zur Tumorbilogie (z.B. der Modulation der Immunantwort durch Krebszellen oder der Proliferation) dieser Zellen lassen sich an in-vitro Kulturen treffen.
- Gene, die vorteilhafterweise an in-vitro kultivierten Krebszellen charakterisiert werden, sind z.B. folgende: Bax, FAS, Cycline, mdm2, p21, p16, bcl-2, c-myc, FGF, MDR1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , erb-B2 und EGF.
- Das erfindungsgemäße Verfahren läßt sich unabhängig vom Stadium eines Krebses anwenden. Es kann allein oder in Kombination mit anderen Krebsdiagnoseverfahren, wie bildgebenden oder auf herkömmlichen Tumormarkern basierenden Verfahren, eingesetzt werden. Das erfindungsgemäße Verfahren kann zur Prävention, beim Auftreten erster Warnzeichen für Krebs oder beispielsweise nach einer Therapie eines Krebses zur Rezidiv-Früherkennung eingesetzt werden. Es eignet sich zur Charakterisierung und Identifizierung sämtlicher Krebsformen, soweit entsprechende zirkulierende Krebszellen in den untersuchten Körperflüssigkeiten vorhanden sind. Hierzu gehören beispielsweise Abdominalkrebs, Analkrebs, Beckenkrebs, Gallengangkrebs, Gebärmutterkrebs, Gebärmutterschleimhautkrebs, Gehirnkrebs, Kopf- und Nackenkrebs, Lippenkrebs, Mundkrebs, Nierenkrebs, Parotiskrebs, Zungenkrebs, Leistenkrebs, Weichteilkrebs, Lymphome, Leukämien, multiple Leukämien, und bevorzugt Mammakarzinome, Sarkome, Ovarkarzinome, Lungenkarzinome, Pankreaskarzinome, Colonkarzinome, Rectumkarzinome, Prostatakarzinome, Leberkarzinome, Blasenkarzinome, Magenkarzinome, Schilddrüsenkarzinome, Cervixkarzinome, Endometriumkarzinome, Melanome, Non-Hodgkin-Lymphome und chronische myeloische Leukämien.

Insbesondere interessant ist der Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens bei lymphknotenfreien Krebsformen, da in diesem Fall herkömmliche, auf der Untersuchung von Lymphknoten basierende Verfahren versagen.

- 5 Werden zirkulierende Krebs-zellen bei NO-Tumoren (beispielsweise einem Mamma- oder Colonkarzinom) nachgewiesen, sind aufgrund der besonderen Konstellation gezielte Aussagen zur Therapiewahl möglich. So ist in diesen Fällen vorzugsweise eine adjuvant-kurative Therapie  
10 angezeigt, bei fortgeschrittenen Tumoren gegebenenfalls mit einer nachgeschalteten zusätzlichen immunomodulatorischen Therapie.

- Unabhängig davon, ob nur auf krebsspezifische oder zusätzlich  
15 auch auf krebsassoziierte Gene untersucht wird, ist es erfindungsgemäß bevorzugt, wenigstens auf zwei verschiedene Gene zu untersuchen, so daß erfindungsgemäß ein Verfahren zur multiplen Charakterisierung disseminierter und mikrometastasierter Krebszellen bereitgestellt wird.

- 20 Eine erste Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens richtet sich auf den Nachweis zirkulierender Krebszellen. Zu diesem Zweck wird vorzugsweise die Expression krebsspezifischer Gene gemessen. Besonders bevorzugt sind Multiparameter-  
25 Expressionsanalysen solcher Genen, die bei Nicht-Krebszellen der untersuchten Körperflüssigkeit abgeschaltet sind. Diese Analysen können bis zu etwa 40 Gene umfassen. In der Regel werden bis zu etwa 25 Gene, vorzugsweise etwa 2 bis 10 Gene und insbesondere etwa 3 bis 7 Gene untersucht. Vorzugsweise  
30 werden die entsprechenden mRNA's, insbesondere durch RT-PCR, analysiert.

- Besonders effektive Kombinationen umfassen die Gene CEA und CK20, wobei die Analyse der entsprechenden mRNA's bevorzugt  
35 ist. Diese Kombinationen können gegebenenfalls durch eine Untersuchung auf MUC1 vorteilhaft ergänzt werden, wobei man insbesondere die Relation zwischen der tumorspezifischen 336BP-Splicevariante und der natürlichen 309BP-Splicevariante

- analysiert. Derartige Untersuchungen sind besonders zum Nachweis zirkulierender Krebszellen vom Karzinomtyp brauchbar. Bevorzugt sind in diesem Zusammenhang gynäkologische Karzinome, wie Ovar-, Mamma- oder verschiedene
- 5 Gebärmutterkarzinome, Colonkarzinome, Lungenkarzinome, Magenkarzinome, Schilddrüsenkarzinome, Blasenkarzinome Endometriumkarzinome und Prostatakarzinome. Die Untersuchung kann ohne vorherige Abtrennung der Krebszellen erfolgen. Bei Blutuntersuchungen verwendet man bevorzugt die MNC-Fraktion.
- 10 Weitere effektive Kombinationen umfassen das MAGE3- und Tyrosinase-Gen, wobei die Analyse der entsprechenden mRNA's bevorzugt ist. Diese Kombinationen können gegebenenfalls durch eine Untersuchung auf Muc18 vorteilhaft ergänzt werden.
- 15 Derartige Untersuchungen sind insbesondere zum Nachweis zirkulierender Krebszellen vom Melanomtyp brauchbar.

- Die vorstehend genannten Expressionsanalysen können durch weitere Nachweisverfahren krebsspezifischer Gene ergänzt
- 20 werden. Zu diesem Zweck werden vorzugsweise Untersuchungen auf Onkogene und/oder mutierte Tumorsuppressor-Gene angestellt, wobei insbesondere auf die oben genannten erfindungsgemäß bevorzugten Gene dieser Art zurückgegriffen werden kann. Derartige Analysen, insbesondere zum Nachweis
- 25 von Mutationen, Amplifikationen, LOH's, Translokationen oder Polymorphismen, werden vorteilhafterweise auf DNA-Ebene, beispielsweise durch DNA-Sequenzierung- oder Hybridisierungstechniken, durchgeführt und können bis zu etwa 40 Gene umfassen. In der Regel werden bis zu etwa 20 Gene,
- 30 vorzugsweise etwa 2 bis 10 Gene und insbesondere etwa 3 bis 7 Gene untersucht.

- Besonders effektive Kombinationen umfassen die Gene p53 und/oder erb-B2. Dabei wird p53 vorzugsweise anhand der
- 35 entsprechenden cDNA auf Mutationen und/oder LOH und erb-B2 vorzugsweise auf DNA-Ebene auf Amplifikationen untersucht. Diese Kombinationen können gegebenenfalls durch Untersuchungen auf c-myc und/oder K-ras, wobei c-myc bevorzugt auf DNA-Ebene

auf Amplifikation und K-ras auf Mutationen untersucht wird, und/oder durch Untersuchungen auf RB, APC, DCC und/oder DPC4, vorzugsweise anhand von LOH's, vorteilhaft ergänzt werden.

- 5 Diese erste Anwendung kann dadurch ergänzt werden, daß man die zirkulierenden Krebszellen auf Gene untersucht, die Aussagen über deren Ursprung zulassen, d.h. eine Organlokalisation der Streuquelle erlauben. Dies kann auch in Form von Multiparameter-Expressionsanalysen geschehen, bei
- 10 denen organotypische Morphogene gemessen werden. Solche Analysen können bis zu etwa 36 Gene umfassen. In der Regel werden bis zu etwa 14 Gene, vorzugsweise etwa 1 bis 8 und insbesondere 2 bis 5 Gene untersucht.
- 15 Besonders effektive Kombinationen umfassen die Maspin- und/oder PR-Gene insbesondere für den Nachweis von Mamma-  
karzinomen, wobei vorzugsweise die entsprechenden mRNA's analysiert werden. Vorteilhaft ergänzt werden kann diese Kombination durch Untersuchungen auf  $\beta$ -hCG und/oder ÖR.
- 20 Analoges gilt für den Nachweis von Ovar- und Cervix-  
Karzinomen, wobei in diesem Fall vorteilhaft durch eine Untersuchung auf SCCA ergänzt werden kann.

- Weitere besonders effektive Kombinationen umfassen die PSM-
- 25 und/oder PSA-Gene insbesondere für den Nachweis von Prostata-  
karzinomen, wobei vorzugsweise die entsprechenden mRNA's analysiert werden. Vorteilhaft ergänzt werden kann diese Kombination durch Untersuchungen auf hK2.

- 30 Weitere besonders effektive Kombinationen umfassen das  
Gastrin-Gen insbesondere für den Nachweis von  
Colonkarzinomen, wobei vorzugsweise die entsprechende mRNA analysiert wird. Auch eine Kombination aus GIP und/oder  
Motilin bietet eine effektive Nachweismöglichkeit von
- 35 Colonkarzinomen.

Weitere besonders effektive Kombinationen umfassen SP-A und  
SP-C insbesondere für den Nachweis von Lungenkarzinomen,

wobei vorzugsweise die entsprechende mRNA analysiert wird. Vorteilhaft ergänzt werden kann diese Kombination durch Untersuchungen auf BhCG.

- 5 Weitere besonders effektive Kombinationen umfassen EGF-R und BhCG insbesondere für den Nachweis von Blasenkarzinomen.

- Eine weitere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft die Erstellung eines Risikoprofils nachgewiesener  
10 zirkulierender Krebszellen, aufgrund dessen eine Prognose gestellt werden kann. Zu diesem Zweck werden vorzugsweise die Metastasierungseigenschaften dieser Krebszellen bewertet.

- Das Risikopotential des Tumors ist außerdem durch die Analyse  
15 von Mutationen und Amplifikationen und/oder verstärkter/verminderter Expression bestimmter Gene zu beschreiben, welche das Wachstumsverhalten der Krebszellen beeinflussen (z.B.: c-myc, c-erb-B2, c-fos, erb-B, mdm2, nm23, p16, p21).

- 20 Ein weiterer wichtiger Faktor zur Risikoeinschätzung ist die Empfindlichkeit des Tumors gegen immunologische Attacken des betroffenen Organismus. Viele Effektormechanismen bedingen die Apoptose der Zielzelle (Tumorzelle). Wenn ein Tumor diesen Abwehrmechanismen widersteht, ist das für diesen ein  
25 enormer Vorteil. Apoptose-relevante Gene können anzeigen, inwieweit ein Tumor gegen die Attacken der Abwehrzellen resistent oder empfindlich ist, oder eventuell sogar selbst Attacken gegen die Effektorzellen ausüben kann (z.B.: Perforin, Granzym, bax, bcl-2, fas, fas-L, GADD45, p53, TNF-  
30 R1, TNF-R2 ).

- Von ebenso wichtiger Bedeutung ist die Quantifizierung der Tumorzellen im Blut. Es ist entscheidend, ob sich die Anzahl zirkulierender Tumorzellen vor und nach operativem Eingriff  
35 oder Therapie unterscheiden. Eine Quantifizierung der Krebszellen anhand der oben angegebenen krebsspezifischen Gene mit Hilfe von Longitudinalstandards erlaubt eine solche Aussage.



Zur Erstellung eines solchen Risikoprofils werden Multiparameter-Expressionsanalysen bevorzugt. Diese können bis zu etwa 50 Gene umfassen. In der Regel werden bis zu etwa 25 Gene, vorzugsweise etwa 2 bis 15 Gene und insbesondere etwa 4 bis  
5 12 Gene untersucht.

Zur Risikoabschätzung insbesondere bevorzugt ist die Bewertung der Metastasierungseigenschaften; man stellt dabei vorzugsweise auf die Fähigkeit der Krebszellen zur  
10 Matrixdegradation und zur Steuerung der Angiogenese ab. In diesem Zusammenhang greift man insbesondere auf die oben genannten Angiogenesefaktoren und/oder Proteasen sowie deren Gegenspieler zurück.

15 Besonders effektive Kombinationen zur Charakterisierung der Metastasierungseigenschaften umfassen bFGF, bFGF-R, VEGF-R1 und/oder VEGF-R2 gegebenenfalls zusammen mit VEGF, wobei bevorzugt die entsprechenden mRNA's untersucht werden. Diese Kombinationen können gegebenenfalls durch Untersuchungen auf  
20 MMP's, insbesondere MMP2, und/oder TIMP's, insbesondere TIMP3, ergänzt werden, wobei man auch hier bevorzugt die entsprechenden mRNA's untersucht.

Effektive Kombinationen zur tumorbiologischen Untersuchung  
25 umfassen die FAS-L- und FAS-R-Gene, die vorzugsweise anhand der entsprechenden mRNA's untersucht werden. Vorteilhaft ergänzt werden kann diese Kombination durch Untersuchungen auf Cycline, insbesondere Cyclin B1, D1 und E, Ki67, bax und/oder bcl-2.

30 Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens liegt darin, daß sich individuelle Risikoprofile für einzelne Patienten erstellen lassen. Da das Verfahren insbesondere zur kontinuierlichen Anwendung geeignet, d.h. jederzeit wieder-  
35 holbar ist, können anhand der Veränderung solcher Risikoprofile wertvolle Aussagen über die Entwicklung eines Krebses für einen individuellen Patienten getroffen werden. Ein weiterer Vorteil ist, daß somit nicht auf Statistiken zurück-

gegriffen werden muß, die im allgemeinen auf Erhebungen beruhen, bei denen Patienten mit sehr unterschiedlichen Voraussetzungen gemittelt werden.

- 5 Eine weitere Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft die Therapie eines nachgewiesenen Krebses. So lassen sich Aussagen zur Therapiewahl, -kontrolle und -resistenz treffen.
- 10 Für die Therapiewahl sind Fragestellungen wichtig, welche die Therapieform oder die Medikamentenwahl betreffen. Hierzu gehören beispielsweise Entscheidungen, ob kurativ oder palliativ, adjuvant oder risikoadaptiert therapiert werden soll, sowie die Beurteilung der Wirksamkeit einer Anti-
- 15 Krebstherapie. Beispielsweise lassen sich Anti-Krebsmittel (Cytostatika), die zum programmierten Zelltod (Apoptose) führen, auf ihre Wirksamkeit prüfen, indem man apoptose-assoziierte Gene untersucht. Insbesondere eignen sich zu diesem Zweck die Analyse verschiedener mRNA's oben
- 20 beschriebener apoptoseassoziiierter Gene. Diese Tests werden vorzugsweise an zirkulierenden Krebszellen durchgeführt, die in-vitro kultiviert werden. Dem Patienten müssen somit keine Cytostatika verabreicht werden.
- 25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch Verwendung erfindungsgemäß charakterisierter, disseminierter und mikrometastasierter Krebszellen zum Testen von Wirkstoffen auf antineoplastische Wirkung.
- 30 Grundsätzlich können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren alle Anti-Krebstherapien bewertet werden. Hierzu zählen beispielsweise Vaccine, Immunmodulation, molekulare Therapien, wie Gen-Replacement, Antisense-Nucleotide, Ribozyme, monoklonale Antikörper, MMP-Inhibitoren und attenuierte Viren, z.B. E1B-
- 35 attenuierte Viren zur Cytolyse p53wt-defizienter Krebszellen.

Da das erfindungsgemäße Verfahren auf molekularbiologischen

Untersuchungen beruht, eignet es sich in hervorragender Weise dazu, Information bezüglich der Therapiewahl zu liefern, die der molekularen Ausstattung der untersuchten Krebszellen angepaßt sind.

5

Es ist davon auszugehen, daß eine erfolgreiche Anti-Krebs-therapie zur Abnahme und günstigstenfalls zum vollständigen Verschwinden zirkulierender Krebszellen und/oder zum Verlust von Risikofaktoren führt. Spricht eine Krebsform auf eine bestimmte Therapie nicht an, ist in der Regel davon  
10 auszugehen, daß die Zahl der zirkulierenden Krebszellen nicht ab- sondern ggf. zunimmt oder daß sich das patienten-spezifische Risiko vergrößert. Es ist somit möglich, den Verlauf einer Krebserkrankung bzw. deren Therapie durch  
15 wiederholte Anwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zu bewerten. Durch einen zeitabhängigen Vergleich können somit die Wirksamkeit einer Therapie beurteilt und auf einfache Weise auch Resistenzen gegenüber bestimmten Therapieformen erkannt werden. Deren Auftreten kann darüber hinaus durch  
20 Untersuchungen zirkulierender Krebszellen auf Chemoresistenz-Gene nach Applikation von Therapeutika an den Patienten bestätigt werden.

Die Analyse verschiedener Zielgene bestimmter Therapeutika,  
25 wie EGP (Antikörper gegen epitheliales Antigen), c-erb-B2 (Anti-erb-B2-Antikörper-Mustard Komplex), MMP (Anti-Protease-Therapie), PR und ÖR (Anti-Hormon-Therapie), bFGF (Anti-bFGF-Therapie) oder Topoisomerase II (Doxorubicin u.a.) können Aussagen über die spezifische Wirkung der Substanzen  
30 erlauben, indem die "Targetparameter" direkt quantifiziert werden. Der Erfolg einer cytostatischen Therapie mit mikrotubulistabili-sierenden Taxanen (z.B. Taxol) kann durch den Nachweis der RNA-Expression der monomeren Targetmoleküle ( $\alpha$ -und  $\beta$ -Tubuline), deren Assembly unter Taxol verhindert  
35 wird, vorhergesagt werden. Eine Resistenz von Krebszellen gegen Cytostatika (z.B. Cisplatin) kann durch den Verlust der Expression von DNA-Reparaturgenen (z.B. hMLH1) nachgewiesen werden. Weiterhin kann durch die Erzeugung von in-vitro

Systemen an patienteneigenen Tumorzellen direkt die Wirkung verschiedenster Therapeutika vorgetestet werden, um auf diese Weise die bestmögliche Behandlungsform zu ermitteln.

- 5 Besonders effektive Kombinationen zur Beurteilung einer möglicherweise bestehenden Chemoresistenz umfassen die Gene MDR1, MRP, Topoisomerase II und Glutathion-S-Transferase-pi, wobei man beispielsweise die entsprechenden mRNA's mißt. Ergänzend können auch  $\beta$ -Tubulin-Mutationen und MDR1-Amplifi-  
10 kation untersucht werden. Bezüglich der MDR1-Untersuchung greift man auch häufig auf die Analyse der MDR1-Pumpe-gp170 und/oder den MDR1-Efflux-Doxorubicin-Test zurück.

- Ein besonderer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens  
15 besteht darin, daß therapierefraktäre Zellen (minimal residual disease; MRD) charakterisiert und identifiziert werden können und in Anlehnung daran ein schon ausgeführter Therapieansatz risikoadaptiert erweitert werden kann, um die residuellen Krebszellen vollständig zu eliminieren.

- 20 Obwohl das erfindungsgemäße Verfahren in erster Linie im Hinblick auf die Charakterisierung humaner Gene beschrieben worden ist, soll es nicht darauf beschränkt sein. Vielmehr erschließen sich dem Fachmann eine Reihe weiterer  
25 Anwendungen, wie die in Tiermodellen zur Beantwortung von Fragestellungen, die den obigen entsprechen oder zumindest ähnlich sind.

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Mittel zur  
30 Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens. Derartige Mittel sollten möglichst einfach handhabbar und im wesentlichen gebrauchsfertig sein. Vorteilhaft verwendet man Mittel zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens in Kit-Form, beispielsweise als Test- und/oder Diagnosekit. Ein  
35 solcher Kit beinhaltet wenigstens ein Kompartiment, beispielsweise ein Vial oder Teströhrchen, in dem die Mittel zur erfindungsgemäßen Untersuchung auf obige Gene möglichst in aliquotierten Mengen enthalten sind. Üblicherweise umfaßt

der Kit mehrere Kompartimente, wobei ein Kompartiment der Untersuchung auf ein bestimmtes Gen zugeordnet sein kann, aber auch Mittel umfassen kann, die zur Untersuchung mehrerer Gene verwendet werden können. Unter Umständen können auch  
5 mehrere Kompartimente der Untersuchung auf ein bestimmtes Gen zugeordnet sein. Gegebenenfalls umfasst der Kit auch ein weiteres Kompartiment zur Aufnahme der Körperflüssigkeitsprobe. Der Kontakt der Körperflüssigkeitsprobe mit den Mitteln zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens  
10 kann gegebenfalls in einem weiteren Kompartiment stattfinden. Die Wahl der Mittel richtet sich nach den untersuchten Genen und der gewählten Methode.

Erfindungsgemäße Diagnose- und/oder Testkits können Mittel  
15 zur Aufbereitung der Körperflüssigkeitsprobe, z.B. Mittel zur Anreicherung von Zellen aus Körperflüssigkeiten, wie Dichtegradienten und/oder Filter, Mittel zur Isolation und Reinigung von DNA und/oder RNA aus Zellen, insbesondere auf Guanidinisothiocynat basierende Systeme, Spin-Säulen mit  
20 geeigneten Festphasen und/oder Oligo-dT-Systeme; Mittel zur Durchführung der Reversen Transkription (RT), z.B. Reverse Transkriptase, RT-Puffer, RNase-Inhibitor, geeignete Primer und/oder dNTPs; Mittel zur Durchführung der PCR, z.B. thermostabile Polymerase, PCR-Puffer,  $MgCl_2$  und/oder dNTPs;  
25 Mittel zur Durchführung restriktionsenzymatischer Verdauungen (RV), z.B. Restriktionsenzym und RV-Puffer; und/oder Mittel zur Analyse der mittels RT, PCR, und/oder RV erhaltenen Produkte, z.B. Gele bzw. Mittel für die Zubereitung zweckmäßiger Gele, ELISAs u.ä., enthalten.

30 Andererseits können viele der zur Durchführung obiger Methoden erforderlichen Mittel, häufig sogar in Kit-Form, auch im Handel bezogen werden, so daß es zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens lediglich ergänzender Mittel  
35 bedarf. Derartige erfindungsgemäße Ergänzungskits stellen vorzugsweise zweckmäßige Primer, Sonden und/oder Negativ-/Positivkontrollen sowie gegebenfalls weitere Hilfsmittel zur Verfügung.

Bevorzugt werden erfindungsgemäße Kits bzw. Ergänzungskits, welche die Untersuchung auf die oben beschriebenen als effektiv herausgestellten Genkombinationen ermöglichen. Derartige Kits werden mit der Zielsetzung verwendet, Krebs im

5   allgemeinen nachzuweisen, Primärtumore zu lokalisieren, eine Risiko- und Prognoseabschätzung vorzunehmen oder Aussagen im Hinblick auf eine Therapie zu treffen. Für eine umfassende Beurteilung eines Krebses können derartige Kits in einer Art Baukastensystem kombiniert werden.

10

Andererseits können erfindungsgemäße Kits auch Mittel enthalten, die Untersuchungen auf Gene zur krebsspezifischen und krebsassoziierten Charakterisierung einer bestimmten Krebsart ermöglichen. Beispielsweise kann ein Melanom-

15   spezifischer Kit wenigstens Mittel zur Untersuchung auf Tyrosinase und bFGF, ein Colon-spezifischer Kit wenigstens Mittel zur Untersuchung auf CK20, bFGF und MMP2 und ein Mamma-spezifischer Kit wenigstens Mittel zur Untersuchung auf CK19, bFGF, MMP2 und PR enthalten.

20

Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken.

25

**Referenzbeispiel 1:**

**Isolierung mononukleärer Zellen (MNC) aus Blut**

Man befüllt ein Zentrifugenröhrchen (50 ml) mit 15 ml Dichtegradientenmedium (DGM) 1.077 (RT) und überschichtet

30   vorsichtig mit 30 ml Blut/PBS (Heparinisiertes oder EDTA-Blut). Nach 30-minütiger Zentrifugation (800g, RT) werden alle Interphase-Zellen (MNC) mit einer Pasteurpipette in ein neues mit 6 ml PBS/Zus (PBS + BSA 0.2%, Natriumazid 0.02%, EDTA 1 mM) befülltes Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt. Ab

35   hier werden alle Schritte unter Kühlung (4°C) durchgeführt. Es wird zentrifugiert (10 Min. 600g, 4°C), die Zellen werden in 10 ml PBS/Zus aufgenommen und die Zellzahl durch Trypan-Blau-Färbung (95 µl TB-Lösung + 5 µl Zelllösung) bestimmt

- (Zellzahl = Zellzahl aus 16 Kleinquadraten (Neubauer)  $\times 2 \times 10^6$ ). Es wird zentrifugiert (10 Min. 400g, 4°C), die Zellen werden in eiskühlem PBS/Zus aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt (bei einer
- 5 Zellzahl bis  $2.5 \times 10^7$  in 0.5 ml; bei  $2.5 \times 10^7$  bis  $5 \times 10^7$  in 1 ml. Dann wird zur RNA/DNA-Isolation Fraktion A (1/4 Vol. bei 20 ml, 1/6 Vol. bei 30 ml) entnommen, die darin enthaltenen Zellen werden zentrifugiert (400g, 3 min), das resultierende Pellet wird in 600  $\mu$ l RLT-Me-Puffer (aus RNEasy Blood Kit
- 10 Quiagen) resuspendiert und bei -80°C gelagert. Schließlich wird 10%-iges FC-Blocking-Reagens zugegeben.

#### Referenzbeispiel 2:

##### **Isolierung epithelialer Tumorzellen aus Vollblut**

- 15 Anti-Epithelial-Beads (40  $\mu$ l/0.5 ml) werden zweimal mit 800  $\mu$ l PBS/Zus in einer Magnetleiste gewaschen. 40  $\mu$ l/0.5 ml gewaschene Beads werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben, man läßt das Reaktionsgefäß in einem Rotor 25 min bei 4°C rotieren, und man stellt es dann in einen Reaktions-
- 20 gefäß-Ständer gestellt, und die Suspension vom Reaktionsgefäß-Deckel wird in das Reaktionsgefäß gegeben. Das Reaktionsgefäß wird 1 min in MPC gegeben, die Zellsuspension wird verworfen, die Magnetleiste wird abgenommen (oder das Gefäß herausgenommen), es werden 800  $\mu$ l PBS/Zus hinzugeben
- 25 und vorsichtig resuspendiert. Die letzte Schrittfolge wiederholt man 6-mal, wobei zuletzt in PBS/1mM EDTA (ohne BSA) resuspendiert wird.
- Das Reaktionsgefäß wird 1 min in MPC gegeben und der Überstand vollständig entfernt. Die resultierenden Beads mit
- 30 anheftenden Zellen bilden die Fraktion C. Diese wird für die RNA/DNA-Isolation in 200  $\mu$ l Trizol resuspendiert und bei -80°C gelagert. Als Reinheitmarker der Fraktion C kann man Perforin-mRNA messen.
- Die Auswertung erfolgt über die Bestimmung tumorassoziierter
- 35 und tumorspezifischer RNA sowie über die Bestimmung der RNA des epithelialen Glycoproteins mittels Quantifizierung der GAPDH-RNA.

**Referenzbeispiel 3:****DNA/RNA-Isolierung**

Die DNA/RNA-Isolierung wird in an sich bekannter Weise durchgeführt.

5

**Referenzbeispiel 4:****CK20- und CEA-mRNA-Analyse mittels RT-PCR**

Zum Nachweis von Epithelzellen im Blut wird der Gehalt an CK20-mRNA molekularbiologisch mit einer Sensitivität von mehr  
10 als 1 Zelle auf  $10^6$  Leukozyten organspezifisch (Ovar, Colon > Mamma) bestimmt. Außerdem wird der CEA-mRNA-Gehalt untersucht. Dieser Nachweis von Zellen, die das onkogene Adhären CEA bilden, wurde mit einer Sensitivität von einer Krebszelle auf  $10^6$  Leukozyten geführt.

15

**Versuchsablauf**

Reverse Transkription (RT):

Folgende Reagenzien werden zusammengegeben (RT-Mix):

- 2,35  $\mu$ l  $H_2O$
- 20 4  $\mu$ l 5x First-Strand-Puffer
- 2  $\mu$ l 0,1 M DTT
- 0,15  $\mu$ l RNA-Guard (38950 U/ml)
- 0,5  $\mu$ l Random-Primer (500  $\mu$ g/ml)
- 0,5  $\mu$ l dNTP-Mix (je 20 mM)
- 25 0,5  $\mu$ l M-MLV (200 U/ $\mu$ l)

10  $\mu$ l aus mononukleären Zellen (5 ml Blut) isolierte RNA (ca. 1  $\mu$ g) werden 1 min bei 70°C denaturiert, sofort auf Eis 3 min abkühlt, mit 10  $\mu$ l RT-Mix luftblasenfrei vermischt, 60 min  
30 bei 37°C inkubiert, 3 min bei 95°C inkubiert, sofort auf Eis 3 min abkühlt und entweder direkt der PCR zugeführt oder bei -20°C eingefroren.

PCR:

- 35 Pro PCR-Ansatz werden folgende Reagenzien zusammengegeben ( $\mu$ l):



		CK20	CEA
	TaqMan-Puffer (10x)	5,0	5,0
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	8,0	8,0
5	dNTP (je 0,75 µl; 2,5 mM)	3,0	3,0
	Primer A (20 pmol/µl)	0,75	0,75
	Primer B (20 pmol/µl)	0,75	0,75
	Sonde TaqMan (20 pmol/µl)	0,5	0,5
	Amplitaq-Gold (PE 5U/µl)	0,5	0,5
10	H <sub>2</sub> O	28,5	28,5
	cDNA aud RT	3,0	3,0

Die PCR wird auf dem ABI 7700 Sequence Detector (TaqMan) durchgeführt. Verwendet wird eine zweistufige PCR-Methode.

15 Folgendes Temperaturprofil wird benutzt:

für CK20:

95<sup>0</sup> C      12 min (Hot-Start-Aktivierung)

95<sup>0</sup> C      30 sec

57<sup>0</sup> C\*      60 sec 45x

20 20<sup>0</sup> C      ∞

für CEA:

95<sup>0</sup> C      12 min (Hot-Start-Aktivierung)

95<sup>0</sup> C      30 sec

58<sup>0</sup> C\*      60 sec 45x

25 20<sup>0</sup> C      ∞

#### Kontrollen:

Pos. (CK20): NCI-H508-Adenokarzinom-Zelllinie

Neg. (CK20): MES-SA/Dx5-Uterussarkom-Zelllinie; Lymphozyten  
eines Normalspenders

Pos. (CEA): NCI-H508-Adenokarzinom-Zelllinie; MCF7-  
Mammakarzinom-Zelllinie

Neg. (CEA): Lymphozyten eines Normalspenders

Primer:

	Primer A	Primer B	Taqman-Sonde
CK20	CK20-sense	CK20-antisense	CK20-Sonde
CEA	CEA-sense	CEA-antisense	CEA-Sonde

5

Analyse der PCR-Produkte:

- Die Ausbeute der ablaufenden PCR-Reaktion wird für jede  
 Cyclus-Runde im Sequence Detector online gemessen. Die dabei  
 aufgezeichnete Kurve des Reaktionsverlaufs dient als  
 10 Grundlage für die Mengenbestimmung der zu analysierenden cDNA  
 als Äquivalent der mRNA. Basis ist die Bestimmung des  
 Übergangs der PCR-Reaktion in die exponentielle Phase.

Referenzbeispiel 5:15 **MUC1-mRNA-Analyse mittels RT-PCR**

Es wird eine Bestimmung der MUC1-mRNA vorgenommen, um die  
 karzinomspezifische Mucin-Transkription zu beurteilen.

Versuchsablauf20 **Reverse Transkription (RT):**

Folgende Reagenzien werden zusammengegeben (RT-Mix):

- 4 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2 µl PCR-Puffer II (10x)
- 2 µl 10 mM dCTP
- 25 2 µl 10 mM dGTP
- 2 µl 10 mM dATP
- 2 µl 10 mM dTTP
- 1 µl RNase-Inhibitor (2000 U)
- 1 µl M-MLV (5000 U)
- 30 1 µl Random Hexamere (5 nmol)

- 5 µl aus mononukleären Zellen (5 ml Blut) isolierte RNA (ca.  
 1 µg) werden zu dem RT-Mix gegeben, 10 min bei Raumtem-  
 peratur, 15 min bei 42° C, 5 min bei 99° C und 5 min bei 5° C  
 35 inkubiert.

Pro PCR-Ansatz werden folgende Reagenzien zusammengegeben  
 (µl):

	MUC1
	PCR-Puffer II (10x)
	8,0
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
	4,0
	Primer A (20 pmol/μl)
	2,0
5	Primer B (20 pmol/μl)
	2,0
	Amplitaq-Gold (PE 5U/μl)
	0,75
	H <sub>2</sub> O
	63,5
	cDNA aus RT
	22,0

- 10 Die PCR wird auf dem Thermocycler Perkin Elmer 9600 oder 2400 durchgeführt. Folgendes Temperaturprofil wird benutzt:

	<u>95°C</u>	<u>10 min</u>	
	95°C	15 sek	
15	<u>60°C</u>	<u>30 sek</u>	35 Zyklen
	72°C	7 min	

Der PCR-Ansatz wird auf 4°C gekühlt.

20 Kontrollen:

Pos.: MES-SA/Dx 5 (Uterussarkom-Zelllinie); exprimiert nur  
336 bp Splicevariante

Neg.: Lymphozyten eines Normalspenders; exprimieren nur  
309 bp Splicevariante

25

Primer:

	Primer A	Primer B
MUC1	MUC S1-sense	MUC S2-antisense
	(5'-6-FAM)	

30

Analyse der PCR-Produkte:

12 μl Formamid, 0,5 μl Genescan Tamra 500 (PE) und 1 μl PCR-Ansatz werden zusammengegeben, 3 min bei 95°C denaturiert, auf Eis inkubiert und im ABI Genescan 310 analysiert

(Anodenpuffer: 2% Polymer, 1x Genetic Analyzer-Puffer;  
Kathodenpuffer: 3% Polymer, 40% Harnstoff, 1x Genetic  
Analyzer-Puffer; Injektionszeit: 10 s; Injektionsspannung:  
7kV; Laufspannung: 13 kV; Lauftemperatur: 30°C; Laufzeit: 18  
5 min; Modul: Short Denatured C).

Zur Auswertung werden die Peakflächen der PCR-Produkte (336  
bp und 309 bp) ermittelt. Es wird der Quotient zwischen der  
Peakfläche der 336 bp-Splicevariante und der 309 bp-  
Splicevariante gebildet (0,2 ist normal, bis 0,7 entspricht  
10 einer schwachen Expression und > 0,7 einer starken  
Expression).

#### Referenzbeispiel 6:

GST-pi-, FAS-R-, FAS-L-, MMP-2-mRNA-Analyse mittels RT-PCR

#### 15 Versuchsablauf:

Die Reverse Transkription (RT) wird gemäß Referenzbeispiel 4  
durchgeführt.

Pro PCR-Ansatz werden folgende Reagenzien zusammengegeben  
20 (µl):

	GST-pi	FAS-R	FAS-L	MMP-2
PCR-Puffer II (10x)	5,0	5,0	5,0	5,0
ROX TIB-MOLBIOL (100 µM)	0,75	0,5	0,5	0,5
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	6,0	8,0	8,0	8,0
25 dNTP (je 0,75 µl) 2,5 mM	3,0	3,0	3,0	3,0
Primer A (20 pmol/µl)	1,0	1,0	0,75	0,75
Primer B (20 pmol/µl)	1,0	1,0	0,75	0,75
Sonde TaqMan (20 pmol/µl)	0,5	0,3	0,5	0,5
Amplitaq-Gold (PE 5U/µl)	0,5	0,5	0,5	0,5
30 H <sub>2</sub> O	29,25	27,7	28,0	28,0
cDNA aus RT	3,0	3,0	3,0	3,0

Die PCR wird auf dem ABI 7700 Sequence Detector (TaqMan)

durchgeführt. Verwendet wird eine zweistufige PCR-Methode.

Folgendes Temperaturprofil wird benutzt:

für GST-pi:

5    95<sup>0</sup> C        10 min (Hot-Start-Aktivierung)  
      95<sup>0</sup> C        30 sec  
      57<sup>0</sup> C        60 sec 40 x  
      20<sup>0</sup> C        ∞

für FAS-R und FAS-L:

10   95<sup>0</sup> C        12 min (Hot-Start-Aktivierung)  
      95<sup>0</sup> C        30 sec  
      55<sup>0</sup> C        30 sec 45 x  
      20<sup>0</sup> C        ∞

für MMP-2:

15   95<sup>0</sup> C        10 min (Hot-Start-Aktivierung)  
      95<sup>0</sup> C        30 sec  
      58<sup>0</sup> C        60 sec 45 x  
      20<sup>0</sup> C        ∞

Cyclenanzahl: (45 für FAS; MMP-2)

## 20   Kontrollen:

Pos. (GST-pi): MES

MNC (GST-pi): Mittels des CT-Wertes der MNC-Kontrolle wird  
 der Grenzwert der normalen Expression  
 festgelegt.

25   Pos. (FAS-R): MNCs (Normalspender); ES-2; MNC-cDNA-  
 Verdünnungsreihe

Neg. (FAS-R): A. dest.

Pos. (FAS-L): MNCs (Normalspender); ES-2; MNC-cDNA-  
 Verdünnungsreihe

30   Neg. (FAS-L): MCF-7 (Mamma-Karzinom); Daudi (Burkitt-  
 Lymphom)

Pos. (MMP-2): COLO-320

Neg. (MMP-2): SW403; Lymphozyten eines Normalspenders

Primer:

	Primer A	Primer B	TaqMan-Sonde
GST-pi	GST-pi-sense	GST-pi-antisense	GST-pi-Sonde
FAS-R	FAS-R-sense	FAS-R-antisense	FAS-R-Sonde
5 FAS-L	FAS-L-sense	FAS-L-antisense	FAS-L-Sonde
MMP-2	MMP-2-sense	MMP-2-anitsense	MMP-2-Sonde

Primer- und Sondesequenzen für FAS wurden entworfen nach  
GenBank Accession # M67454; Primer- und Sondesequenzen für  
10 FAS-L wurden entworfen nach GenBank Accession # U08137.

Analyse der PCR-Produkte:

Analog Referenzbeispiel 4.

15 Referenzbeispiel 7:

**bFGF-R-, bFGF-, VEGF-R2-mRNA-Analyse mittels RT-PCR**

Versuchsablauf:

Die Reverse Transkription (RT) wird gemäß Referenzbeispiel 1  
durchgeführt.

20

Pro PCR-Ansatz werden folgende Reagenzien zusammengegeben  
( $\mu$ l):

	bFGF-R	bFGF	VEGF-R2
25 PCR-Puffer (10x)	5,0	5,0	5,0
dNTP (20 mM)	0,5	0,5	0,5
Primer A (20 pmol/ $\mu$ l)	1	1	1
Primer B (20 pmol/ $\mu$ l)	1	1	1
Taq-Polymerase (PE 5U/ $\mu$ l)	0,25	0,25	0,25
H <sub>2</sub> O	31,55	31,55	31,55
30 cDNA aus RT	5,0	5,0	5,0

Die PCR wird auf dem Thermocycler Perkin Elmer 9600 oder 2400  
durchgeführt. Folgendes Temperaturprofil wird benutzt:

	<u>95°C</u>	<u>5 min</u>	
	95°C	60 sek	
	53°C	60 sek	
	<u>72°C</u>	<u>60 sek</u>	45 x
5	72°C	10 min	

Der PCR-Ansatz wird auf 4°C gekühlt.

Kontrollen:

- |    |                 |   |
|----|-----------------|---|
| 10 | Pos. (bFGF-R):  | ES-2 (Ovarkarzinom); NB-4 (ApML); MCF-7 (Mammakarzinom); 697 (cALL); Colo 829 (Melanom) |
|    | Neg. (bFGF-R):  | Lymphozyten (Normalspender); NCI-H508 (Adenokarzinom); K562 (CML)                       |
| 15 | Pos. (bFGF):    | ES-2 (Ovarkarzinom); K562 (CML); MES-SA/Dx5 (Uterussarkom); Colo 829 (Melanom)          |
|    | Neg. (bFGF):    | Lymphozyten (Normalspender); 697 (cALL); NCI-H508 (Adenokarzinom)                       |
|    | Pos. (VEGF-R2): | ES-2 (Ovarkarzinom); Colo 829 (Melanom); EFM192A (Mammakarzinom)                        |
| 20 | Neg. (VEGF-R2): | Lymphozyten (Normalspender); NCI-H508 (Adenokarzinom)                                   |

Primer:

25		Primer A	Primer B
	bFGF-R	bFGF-R-sense	bFGF-R-antisense
	bFGF-L	bFGF-L-sense	bFGF-L-antisense
	VEGF-R2	VEGF-R2-sense	VEGF-R2-antisense

30 Analyse der PCR-Produkte

- |    |    |  |
|----|----|--|
|    | a) | 20-30 µl des PCR-Ansatzes werden auf einem 2%-igen Agarose-Gel (1xTBE) aufgetrennt.                        |
|    | b) | 6-10 µl des PCR-Produktes werden mit (+) oder ohne (-) Restriktionsenzym 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach |
| 35 |    | Auftrennung in 2%-igem Agarosegel sind zwei kleinere Fragmente zu erkennen.                                |

Restriktion	+	-
Reagenzien	6 (10) $\mu$ l PCR-Produkt 0,5 $\mu$ l R-Enzym 1 (1,5) $\mu$ l Puffer M 2,5 (3) $\mu$ l A. dest.	6 (10) $\mu$ l PCR-Produkt - 1 (1,5) $\mu$ l Puffer M 3 (3,5) $\mu$ l A. dest.

5

**Referenzbeispiel 8:****Tyrosinase-mRNA-Analyse mittels RT-PCR****Versuchsablauf:**

Die Reverse Transkription (RT) wird gemäß Referenzbeispiel 1  
10 durchgeführt.

Pro PCR-Ansatz werden folgende Reagenzien zusammengegeben  
( $\mu$ l):

	1. Runde	2. Runde
15 PCR-Puffer (10x)	5,0	5,0
MgCl <sub>2</sub> (0,1 M)	0,8	0,8
Triton X-100 (1%)	5,0	5,0
dNTP (20 mM)	0,5	0,5
Primer A (20 pmol/ $\mu$ l)	7,5	-
20 Primer B (20 pmol/ $\mu$ l)	7,5	-
Primer C (20 pmol/ $\mu$ l)	-	7,5
Primer D (20 pmol/ $\mu$ l)	-	7,5
Taq-Polymerase (5U/ $\mu$ l) + Taq-Antikörper 1:1	1,0	1,0
25 H <sub>2</sub> O	20,7	20,7
cDNA aus RT	2,0	-
PCR-Produkt aus 1. Runde	-	2,0*

\* Positivkontrolle 100-fach verdünnen



Die PCR wird auf dem Thermocycler Perkin Elmer 9600 oder 2400 durchgeführt. Folgendes Temperaturprofil wird benutzt:

	<u>95°C</u>	<u>10 min</u>	
5	95°C	60 sek	
	60°C	30 sek	
	<u>72°C</u>	<u>60 sek</u>	30 x
	72°C	10 min	

- 10 Der PCR-Ansatz wird auf 4°C gekühlt.

Kontrollen:

- Pos. (Tyrosinase): COLO-829 cDNA (Humanes Melanom); 697 cDNA (Pre-B-Zell-Leukämie)
- 15 Neg. (Tyrosinase): Prämix ohne Proben-DNA (Obligat); MES (Uterussarkom); LNCAP (Prostatakarzinom)

Primer:

		Primer A	Primer B	Primer C	Primer D
20	Tyrosinase	HTYR-1	HTYR-2	HTYR-3	HTYR-4

Analyse der PCR-Produkte:

- 10 µl PCR-Produkt und 1,1 µl Proben-Puffer werden zusammen mit 10 µl 100 bp-Leiter einer Agarose-Gelelektrophorese bei
- 25 einer Laufspannung von 150 Volt und einer Laufzeit von 20 min unterzogen. Die Auswertung erfolgt unter einer UV Lampe bei 254 nm oder 312 nm. Das PCR-Produkt nach der 1. Runde besitzt eine Größe von 284 bp. Das PCR Produkt nach der 2. Runde besitzt eine Größe von 207 bp. Als Längenstandard wird die
- 30 100 bp-Leiter verwendet.

Referenzbeispiel 9:

**erb-B2-, c-myc- und mdrl-Amplifikationsanalyse**

- Es werden das erb-B2-, c-myc und mdrl-Gen bzw. das β-Globin-Gen unter Verwendung von Fluorescein-markierten
- 35 Oligonukleotidprimern koamplifiziert. Die Auftrennung der Amplifikate erfolgt mittels Kapillarelektrophorese.

Versuchsablauf:

Pro PCR-Ansatz werden folgende Reagenzien zusammengegeben ( $\mu\text{l}$ ):

		erb-B2	c-myc	mdr1
5	PCR-Puffer (10x, PE)	5,0	5,0	5,0
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM, PE)	4,0	4,0	0,5
	dNTP (20 mM)	0,25	0,25	0,25
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (100 mM)	7,5	7,5	7,5
	Primer A (20 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1,5	2,0	5,0
10	Primer B (20 pmol/ $\mu\text{l}$ )	1,5	2,0	5,0
	Primer c (20 pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,5	0,2	0,5
	Primer d (20 pmol/ $\mu\text{l}$ )	0,5	0,2	0,5
	Amplitaq-Gold (PE, 5U/ $\mu\text{l}$ )	0,4	0,4	0,25
	H <sub>2</sub> O (bidest)	25,85	25,45	23,5
15	DNA	3,0	3,0	2,0

Die PCR wird auf einem Thermocycler Perkin Elmer 2400, 9600 oder 9700 durchgeführt. Folgendes Temperaturprofil wird benutzt:

20

für erb-B2 und c-myc:

95°C      10 min

95°C      1 min

60°C      1 min

25    72°C      1 min      32 x

72°C      3 min

für mdr1:

94°C      5 min

95°C      1 min

30    57°C      1 min

72°C      1 min      35 x

72°C      5 min

Der PCR-Ansatz wird auf 4°C gekühlt.

Kontrollen:

- Pos. (erb-B2): DNA-A  
5 Norm. (erb-B2): humane DNA  
Pos. (c-myc): DNA-B; H82-DNA  
Norm. (c-myc): humane DNA  
Pos. (mdr1): CCRF-DNA  
Norm. (mdr1): humane DNA

10

Primer:

	Primer A	Primer B	Primer C	Primer D
erb-B2	Hex-neu-3	neu-5	PCO-3F	PCO-4
c-myc	Hex-myc-1	myc-2	PCO-3F	PCO-4
15 mdr1	Hex-mdr1-5F	mdr1-5B	PCO-3F	PCO-4

Analyse der PCR-Produkte:

- Die PCR-Produkte werden auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen. Nach der Kapillarelektrophorese (Genetic-  
20 Analyzer ABI 310) wird für jede Patientenprobe und die Kontrollen der Quotient aus erb-B2- c-myc- bzw. mdr1-Flächenintegral und  $\beta$ -Globin-Flächenintegral gebildet. Eine erb-B2- c-myc- bzw. mdr1-Amplifikation in einer Patientenprobe liegt dann vor, wenn der Quotient  
25 "signifikant" größer ist als der der Normalkontrolle, bzw. von gleichzeitig mitgemessenen Proben.

Referenzbeispiel 10:

DCC-, APC-, RB, p53-, Mikrosatelliten (DxSy)-LOH-Analysen

30

Versuchablauf:

Pro PCR-Ansatz werden folgende Reagenzien zusammengegeben ( $\mu$ l):

	DCC	APC	RB	p53	DxSy
5	PCR-Puffer (10x)	5,0	5,0	5,0	3,0
	dNTP-Mix (20 mM; 10 mM für DxSy)	0,5	0,5	0,5	4,8
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	-	-	3,0	3,0
	Primer A (20 pmol/μl)	0,5	0,5	0,5	0,6
	Primer B (20 pmol/μl)	0,5	0,5	0,5	0,6
10	Taq-Polymerase (5U/μl) + Taq-Antikörper 1:1	0,5	0,5	0,5 **	0,3 **
	H <sub>2</sub> O	40,0	40,0	37,0	14,7
	DNA*	3,0	3,0	3,0	3,0

\* 3μl DNA (Fraktion C; Tumorzellfraktion; Abstrich)

15 1 μl DNA (Fraktion A) + 2 μl H<sub>2</sub>O

\*\* Taq-Polymerase Amplitaq Gold

Die PCR wird auf dem Thermocycler Perkin Elmer 9600 oder 2400 durchgeführt. Folgendes Temperaturprofil wird benutzt:

20 Für DCC, APC und RB:

95°C      5 min

94°C      30 sek

53°C      30 sek

72°C      30 sek      30 x

25 72°C      5 min

Für p53:

94°C      10 min

94°C      30 sek

60°C      30 sek

30 72°C      30 sek      40 x

72°C      5 min

Für DxSy:

	<u>95°C</u>	<u>10 min</u>	
	94°C	1 min	
	60°C	30 sek (D17S849 / D19S960)	
5	53°C	30 sek (D16S265 / D11S528)	
	57°C	30 sek (D17S926 / D17S960)	
	<u>72°C</u>	<u>30 sek</u>	40 x
	72°C	10 min	

- 10 Der PCR-Ansatz wird auf 4°C gekühlt.

Kontrollen:

Neg.: Ansatz ohne DNA

- 15 Primer:

		Primer A	Primer B
	DCC-LOH	Hex-DCC LOH-1	DCC LOH-2
	RB-LOH	FAM-RB LOH-1	RB LOH-2
	APC-LOH	FAM-APC LOH-1	APC LOH-2
20	p53-LOH	FAM-p53 LOH-A	p53 LOH-B
	D17S926-LOH	FAM-D17S926 a	D17S926 s
	D17S695-LOH	FAM-D17S695 a	D17S695 s
	D17S849-LOH	FAM-D17S849 a	D17S849 s
	D17S960-LOH	FAM-D17S960 a	D17S960 s
25	D16S265-LOH	FAM-D16S265 a	D16S265 s
	D11S528-LOH	FAM-D11S528 a	D11S528 s

Analyse der PCR-Produkte:

1. Funktionsnachweis der PCR im Agarosegel

- 30 9 µl (15 µl für DxSy) PCR-Produkt und 1 µl (2 µl) 10x TBE-Probenpuffer mit Bromphenolblau werden auf ein 2%iges Agarosegel (10 µl Ethidiumbromid-Stammlösung 10 mg/ml auf 100 ml Gel) in 1 x TBE-Puffer aufgetragen. Die Elektrophorese wird 160 bis 170 V bei konstanter Spannung durchgeführt.

35

2. Nachweis des Allelverlustes mittels ABI 310

12 µl Formamid, 1 µl Probe und 0,5 µl Genescan Tamra 500 (PE) werden 2 min bei 95°C denaturiert und direkt auf Eis

gestellt. Anschließend wird eine Fragmentanalyse auf dem ABI 310 (Analysepuffer; Anode und Kathode: 1x Fragmentanalysenpuffer (PE) mit EDTA; Polymer: POP-4; Injektionszeit: 5 sec; Injektionsspannung: 15 kV; Spannung während des Laufes: 15 kV; Temperatur während des Laufes: 60°C; Laufzeit: 24 min; Matrix: GS POP4C) durchgeführt.

Die Analyse wird sowohl im Gesamtblut, welche das Allelverhältnis in den Normalzellen widerspiegelt, als auch in der Fraktion C, die stellvertretend den Zustand der Krebszellen angibt, durchgeführt. Eine erfolgreiche Analyse kann nur erfolgen, wenn der Patient heterozygot für beide Allele eines Markers ist. Die Allele unterscheiden sich in ihrer Größe um mindestens 4 bp. Die Quotienten der Peakflächen beider Allele (Allel 1/Allel 2) in der Gesamtblutfraktion werden mit denjenigen der Fraktion C verglichen. Wenn sich die Werte um mindestens 50 % unterscheiden, kann von einem LOH ausgegangen werden.

20 **Referenzbeispiel 11:**

**p53-und K-ras-Mutationsanalysen**

**Versuchablauf:**

Pro PCR-Ansatz werden folgende Reagenzien zusammengegeben ( $\mu$ l):

	Cod. 175	Cod. 245	Cod. 248	Cod. 249	Cod. 273	k- ras
5	PCR-Puffer (10x)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
	dNTP-Mix (20 mM)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	DMSO	-	-	2,5	2,5	-
	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	-	-	-	-	6,0
	Primer A (20 pmol/ $\mu$ l)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
10	Primer B (20 pmol/ $\mu$ l)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	Taq-Polymerase (5U/ $\mu$ l) + Taq- Antikörper 1:1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	H <sub>2</sub> O	37,0	37,0	34,5	34,5	31,0
15	DNA	5,0	3,0	5,0	5,0	3,0

Die PCR wird auf dem Thermocycler Perkin Elmer 9600 oder 2400 durchgeführt. Folgendes Temperaturprofil wird benutzt:

20    95°C        5 min  
       94°C        30 sek  
       55°C        30 sek  
       72°C        30 sek    37 (für k-ras 35) x  
       72°C        5 min

25

Der PCR-Ansatz wird auf 4°C gekühlt.

Kontrollen:

30    Pos. (p53; 248):    DNA der akuten Promyelocytischen Leukämie  
                          Zelllinie NB-4; DNA der  
                          Colonkarzinomzelllinien Colo 320  
       Pos. (p53; 273):    SW480-Kolonkarzinomzellen

Pos. (K-ras): SW480- und SW403-Kolonkarzinomzellen  
 Neg. (p53): Ansatz ohne DNA; Ansatz ohne Restriktion  
 Neg. (K-ras): Normallymphozyten-DNA bzw. DNA einer  
 Negativ-Zelllinie

5

Primer:

	Primer A	Primer B
p53 (175)	FAM-p53 175-S	p53 6-2
p53 (245)	FAM-p53 245-A	p53 245-S
10 p53 (248)	FAM-p53 7-1	p53 8-2
p53 (249)	FAM-p53 7-1	p53 8-2TET-p53 8-2
p53 (273)	p53 273-S	TET-p53 8-2
k-ras	k-ras-sense	FAM-markierter K-105- anitsense

15

Analyse der PCR-Produkte:

1. Funktionsnachweis der PCR im Agarosegel  
 9 µl PCR-Produkt und 1 µl 10x TBE-Probenpuffer mit  
 Bromphenolblau werden auf ein 2%iges Agarosegel (10 µl  
 20 Ethidiumbromid-Stammlösung 10 mg/ml auf 100 ml Gel) in 1 x  
 TBE-Puffer aufgetragen. Die Elektrophorese wird 160 bis 170 V  
 bei konstanter Spannung durchgeführt.

2. Restriktionsverdau  
 25 7,3 µl , 2,0 µl 10x Puffer, 0,2 µl 100 x BSA, 0,5 µl  
 Restriktionsenzym und 10 µl PCR-Produkt (für Codon 245, 249  
 und 273: 7,5 µl H<sub>2</sub>O (bidest), 2,0 µl 10x Puffer, 0,5 µl  
 Restriktionsenzym und 10 µl PCR-Produkt; für Codon 248: 7,75  
 µl H<sub>2</sub>O (bidest), 2,0 µl 10x Puffer, 0,25 µl Restriktionsenzym  
 30 und 10 µl PCR-Produkt) werden 1 Stunde bei 37°C inkubiert.  
 Je nach der Menge des PCR-Produktes erfolgt die Auswertung  
 über ein 4%iges Metaphor-Gel oder mittels ABI 310.

Auswertung über Metaphor-Agarosegel:

35 18 µl restringiertes PCR-Produkt und 2 µl 10x TBE-  
 Probenpuffer mit Bromphenolblau werden auf ein 4%iges  
 Metaphor-Agarosegel ( 10 µl Ethidiumbromid-Stammlösung 10  
 mg/ml auf 100 ml Gel) in 1 x TBE-Puffer aufgetragen. Die



Elektrophorese wird 160 bis 170 V bei konstanter Spannung durchgeführt. Zum Vergleich wird auf jedes Gel auch das nicht geschnittene PCR-Produkt einer beliebigen Probe aufgetragen.

- 5 *Nachweis mittels ABI 310*  
12 µl Formamid, 1 µl Probe und 0,5 µl Genescan Tamra 500 (PE) werden 2 min bei 95°C denaturiert und direkt auf Eis gestellt. Anschließend wird eine Fragmentanalyse auf dem ABI 310 (Analysepuffer; Anode und Kathode: 1x Fragmentanalysen-
- 10 puffer (PE) mit EDTA; Polymer: POP-4; Injektionszeit: 5 sec; Injektionsspannung: 15 kV; Spannung während des Laufes: 15 kV; Temperatur während des Laufes: 60°C; Laufzeit: 24 min; Matrix: GS POP4C) durchgeführt.
- 15 Fragmentlängen:  
**Codon 175**  
Wildtyp: 70 bp      227 bp      18 bp  
mutiert: 88 bp      227 bp  
**Codon 245**  
20 Wildtyp: 145 bp      23 bp  
mutiert: 168 bp  
**Codon 248**  
Wildtyp: 77 bp  
mutiert: 246 bp  
25 **Codon 249**  
Genotyp:  
Wildtyp: 81 bp  
mutiert: 147 bp  
**Codon 273**  
30 Wildtyp: 116 bp      21 bp  
mutiert: 137 bp  
**K-ras Codon 12**  
Wildtyp: 114 bp      29 bp      14 bp  
mutiert: 143 bp      14 bp

35

Zur Auswertung wird das Flächenintegral 88 bp zu 70 bp, 168 bp zu 145 bp, 246 bp zu 77 bp, 147 bp zu 81 bp, 137 bp zu 116 bp bzw. 143 bp zu 114 bp gebildet.

**Beispiel 1 (Diagnostische Fragestellung)****a) Klinische Ausgangssituation**

Bei der zu untersuchenden Patientin bestand eine Mastopathie mit Verdacht auf ein Mammakarzinom. Es wurde eine Blutprobe  
5 entnommen.

**b) Fragestellung**

Gab es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten?

**c) Untersuchungen und Resultate**

10	Untersuchung	Ergebnis
	p53-Mutation in Tumorzellen	NEGATIV
	p53(Exon5)-Mutation	NEGATIV
	p53(Exon6)-Mutation	NEGATIV
15	p53(Exon7)-Mutationen	NEGATIV
	p53(Exon8)-Mutationen	NEGATIV
	erb-B2 nach Tumorzellisolierung	POSITIV
	c-myc nach Tumorzellisolierung	POSITIV
	CK20-mRNA	POSITIV
	CEA-mRNA	POSITIV
20	MUC1-mRNA	0.95
	MUC1-mRNA Fraktion C	1.40
	bFGF-mRNA	NEGATIV
	bFGF-R-mRNA	POSITIV
	VEGF-mRNA	POSITIV
25	VEGF-R1-mRNA	POSITIV
	VEGF-R2-mRNA	NEGATIV
	TIMP3-mRNA	NEGATIV
	MMP2-mRNA	NEGATIV
	Progesteron-R-mRNA	POSITIV
30	Maspin-mRNA	POSITIV
	Perforin nach Tumorzellisolierung	NEGATIV

## d) Bewertung

Bei der Patientin ließen sich hämatogen zirkulierende Zellen nachweisen, die vom Karzinomtyp sein können. Krebszell-spezifisch konnten Zellen nachgewiesen werden, welche die krebsspezifische Splice-Variante des Mucin1-Gens verstärkt transkribierten. Auch CEA- und CK20-mRNA wurde von diesen Zellen exprimiert. Da diese Expressionscharakteristika beim Mammakarzinom angetroffen werden, stammten die Zellen höchstwahrscheinlich aus der Mamma, was durch die Expression von Maspin bestätigt wurde.

Die Tumorzellen ließen sich in der Fraktion C (MUC1) ohne lymphozytäre Verunreinigung (Perforin-negativ) anreichern. Die nachgewiesenen Zellen zeigten auch bereits Anzeichen einer Metastasierungsfähigkeit, da sie den bFGF- und VEGF-Rezeptor sowie VEGF exprimierten, allesamt Prärequisite der Neoangiogenese. Die im Blut vagabundierenden Zellen exprimierten den Progesteron-Rezeptor.

Die c-myc- und erb-B2-Amplifikation sprachen darüber hinaus für eine schlechte Prognose. Qualitativ handelte es sich um einen typischen Hochrisiko-Verlauf mit extremer Wachstumspotenz, da diese Gene für Wachstumssignale im Krebsgewebe kodieren.

## e) Zusammenfassung und Schlußfolgerung:

Insgesamt sprach der Befund für ein streuendes Karzinom mit schlechter Prognose, welches der Mastopathie zugrunde lag.

**Beispiel 2 (Identifikation der Streuquelle)**

## a) Klinische Ausgangssituation

Bei dem zu untersuchenden Patienten bestand der Verdacht auf ein Colon- oder Prostatakarzinom. Es wurde eine Blutprobe entnommen.

## b) Fragestellung

Gab es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten? Stammten diese Zellen aus einem Prostata- oder einem Colonkarzinom?

## c) Untersuchungen und Resultate:

	Untersuchung	Ergebnis
	K-ras nach Tumorzellisolierung	POSITIV
5	K-ras(Exon1)-Mutation	POSITIV
	K-ras(Exon1)-Mutation	NEGATIV
	CK20-mRNA	POSITIV
	CEA-mRNA	NEGATIV
	MUC1-mRNA	> 1,00
10	Gastrin-mRNA	POSITIV
	PSM-mRNA	NEGATIV
	bFGF-mRNA	NEGATIV
	bFGF-R-mRNA	POSITIV
	VEGF-mRNA	NEGATIV
15	VEGF-R1-mRNA	NEGATIV
	VEGF-R2-mRNA	NEGATIV
	EGP-mRNA	255370 (entspricht 100%)
	GAPDH-mRNA	125836424 (entspricht 100%)
	EGP-mRNA Fraktion C	1773 (entspricht 0.7% der Fraktion A)
20	GAPDH-mRNA Fraktion C	625 (entspricht 0.0005% der Fraktion A)

## d) Bewertung

Es konnten hämatogen streuende Zellen nachgewiesen werden,  
 25 die ausschließlich die tumorspezifische Splice-Variante des  
 MUC1-Gens als auch CK20 transkribierten und daher dem  
 Karzinomtyp zuzuordnen waren. Sie ließen sich in der Fraktion  
 C anreichern. Die hämatogen streuenden Zellen stammten mit  
 Sicherheit aus dem Colon, da Gastrin-mRNA im Gegensatz zur  
 30 Prostata-spezifischen PSM-mRNA nachgewiesen werden konnte.  
 In der Epithelzellfraktion C wurde auch das punktmutierte  
 Onkogen k-ras gefunden, wie es für Colonkarzinome typisch  
 ist. Die nachgewiesenen Zellen zeigten ebenfalls bereits

Anzeichen einer Metastasierungsfähigkeit, da sie den bFGF-Rezeptor, ein Prärequisit der Neoangiogenese, exprimierten.

e) Zusammenfassung und Schlußfolgerung:

- Insgesamt sprach der Befund für ein streuendes Karzinom, welches sicher colorectal zu suchen war. Eine Therapie mit Panorex schien indiziert, da die Zellen das therapeutische Zielgen EGP exprimierten.

### Beispiel 3 (Prognose)

- 10 a) Klinische Ausgangssituation

Bei der zu untersuchenden Patientin bestand ein malignes Melanom im postoperativen Zustand (Clark II-III).

Es wurde eine Blutprobe entnommen.

b) Fragestellung

- 15 Gab es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten? Konnten weitere prognostische Aussagen zum Tumor gemacht werden?

c) Untersuchungen und Resultate:

	Untersuchung	Ergebnis
20	p53-Mutation in Tumorzellen	POSITIV
	p53(Exon5)-Mutation	POSITIV
	p53(Exon6)-Mutation	NEGATIV
	p53(Exon7)-Mutationen	NEGATIV
	p53(Exon8)-Mutationen	NEGATIV
25	Tyrosinase-mRNA	POSITIV
	MAGE3-mRNA	POSITIV
	Muc18-mRNA	POSITIV
	bFGF-mRNA	NEGATIV
	bFGF-R-mRNA	POSITIV
30	VEGF-mRNA	POSITIV
	VEGF-R1-mRNA	POSITIV
	VEGF-R2-mRNA	NEGATIV
	MMP2-mRNA	POSITIV
	FAS-mRNA in Fraktion C	POSITIV

FAS-Rezeptor-mRNA in Fraktion C	NEGATIV
Perforin nach Tumorzellisolierung	NEGATIV

5

## d) Bewertung

Die Resultate sprachen für ein progressives malignes Melanom mit hämatogen streuenden Zellen, die metastasierungsfähig waren. Für die Metastasierungsfähigkeit der im Blut zirkulierenden Zellen sprach die Expression der Angiogenesefaktoren bFGF-Rezeptor, VEGF-Rezeptor 1 und VEGF ebenso wie die Fähigkeit der zirkulierenden Zellen zur Matrixdegradation (MMP2-mRNA nachgewiesen). In der Fraktion C fand sich eine proteinrelevante Mutation des Onkogens p53 in Exon 5. Die Zellen exprimierten nur FAS-Ligand, nicht aber FAS-Rezeptor; sie waren möglicherweise einer zellvermittelten Cytotoxizität (Apoptose) nicht zugänglich. Eine lymphozytäre Verunreinigung der Fraktion C wurde ausgeschlossen, da sich Perforin nicht nachweisen ließ.

20

**Beispiel 4 (Therapierelevanz)**

## a) Klinische Ausgangssituation

Bei der zu untersuchenden Patientin wurde ein Mammakarzinom diagnostiziert (pT1b N1 M0). Es wurde eine Blutprobe entnommen.

## b) Fragestellung

Gab es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten? Bestand eine Chemoresistenz?

30

## c) Untersuchungen und Resultate:

	Untersuchung	Ergebnis
	p53-Mutation in Tumorzellen	POSITIV
5	p53 (Exon5)-Mutation	NEGATIV
	p53 (Exon6)-Mutation	NEGATIV
	p53 (Exon7)-Mutationen	NEGATIV
	p53 (Exon8)-Mutationen	POSITIV
	CK20-mRNA	POSITIV
10	CEA-mRNA	POSITIV
	MUC1-mRNA	0.90
	MUC1-mRNA Fraktion C	1.40
	bFGF-mRNA	NEGATIV
	bFGF-R-mRNA	POSITIV
15	VEGF-mRNA	POSITIV
	VEGF-R1-mRNA	POSITIV
	VEGF-R2-mRNA	NEGATIV
	Maspin-mRNA	POSITIV
	MDR1-Efflux-Doxorubicin-Test	55 % (Ref.: 40 - 65 %)
20	MDR1-Pumpe-gp170	61 % (Ref.: 40 - 65 %)
	MDR1 (menschliches Genom)	NEGATIV
	MDR-mRNA Fraktion C	NEGATIV
	MRP-mRNA Fraktion C	NEGATIV
	GST-pi-mRNA Fraktion C	NEGATIV
25	Topoisomerase-II-mRNA Fraktion C	POSITIV

## d) Bewertung

Bei der Patientin ließen sich hämatogen zirkulierende Zellen nachweisen, die vom Karzinomtyp sein konnten. Krebszell-spezifisch konnten Zellen nachgewiesen werden, welche die krebsspezifische Splice-Variante des Mucin1-Gens verstärkt transkribierten. Auch CEA- und CK20-mRNA wurde von diesen Zellen exprimiert. Da diese Expressionscharakteristika beim

Mammakarzinom angetroffen werden, stammten die Zellen höchstwahrscheinlich aus der Mamma, was durch die Expression von Maspin bestätigt wurde.

- Die nachgewiesenen Zellen zeigten auch bereits Anzeichen einer Metastasierungsfähigkeit, da sie den bFGF- und VEGF-Rezeptor sowie VEGF exprimierten, allesamt Prärequisite der Neoangiogenese. Außerdem ließ sich in der Tumorzellfraktion eine p53-Mutation in Exon 8 nachweisen. Dies ist ebenfalls ein für das Mammakarzinom typischer Befund.

10

e) Zusammenfassung und Schlußfolgerung:

Insgesamt sprach der Befund für ein metastasierungsfähiges Karzinom. Bei der Patientin bestand kein Hinweis auf eine Chemoresistenz. Aufgrund der nachgewiesenen Topoisomerase-Expression als Zielgen schien eine Antrazyklintherapie indiziert zu sein.

15

**Beispiel 5 (vor Chemotherapie)**

- 20 a) Klinische Ausgangssituation

Bei der zu untersuchenden Patientin wurde ein Mammakarzinom diagnostiziert. Die Patientin stand nicht unter Chemotherapie. Es wurde eine Blutprobe entnommen.

- 25 b) Fragestellung

Gab es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten? Bestand eine Chemoresistenz?

c) Untersuchungen und Resultate:

30

Untersuchung	Ergebnis
p53-Mutation in Tumorzellen	NEGATIV
p53(Exon5)-Mutation	NEGATIV
p53(Exon6)-Mutation	NEGATIV
p53(Exon7)-Mutationen	NEGATIV
35 p53(Exon8)-Mutationen	NEGATIV
erb-B2 nach Tumorzellisolierung	NEGATIV



	c-myc nach Tumorzellisolierung	NEGATIV
	CK20-mRNA	POSITIV
	CEA-mRNA	POSITIV
	MUC1-mRNA	0.55
5	bFGF-mRNA	NEGATIV
	bFGF-R-mRNA	NEGATIV
	VEGF-mRNA	NEGATIV
	VEGF-R1-mRNA	NEGATIV
	VEGF-R2-mRNA	NEGATIV
10	MDR1-Pumpe-gp170	18 % <sup>1)</sup> (Ref.: 40 - 65 %)
	MDR1 (menschliches Genom)	NEGATIV
	MDR1-mRNA	POSITIV
	GST-pi-mRNA	POSITIV
	Topoisomerase-II-mRNA	POSITIV
15	MRP-mRNA	POSITIV
	EGP-mRNA	30743 (entspricht 100 %)
	GAPDH-mRNA	1765600 (entspricht 100 %)
	EGP-mRNA Fraktion C	1
	GAPDH-mRNA Fraktion C	0
20	MUC1-mRNA Fraktion C	> 1,00
	bFGF-mRNA Fraktion C	0,00

1) Unspezifische Antikörper-Bindungskapazität (ABC): 953  
Spezische ABC: 2935

25

#### e) Bewertung

Bei der Patientin ließen sich hämatogen zirkulierende vom Karzinomtyp nachweisen, welche die krebsspezifische Splice-Variante des MUC1-Gens transkribierten. Auch die Expression von CEA und CK20 konnte nachgewiesen werden. Diese

30 Expressionscharakteristika sprachen für ein Mammakarzinom. Da

die Analyse der obigen Angiogenesefaktoren negativ ausfiel, konnte davon ausgegangen werden, daß die zirkulierenden Krebszellen nur ein geringes Metastasierungspotential zeigten. Bei der Patientin bestand kein Hinweis auf eine

5 Chemoresistenz.

e) Zusammenfassung und Schlußfolgerung:

Insgesamt sprach der Befund für ein streuendes Mammakarzinom ohne Anzeichen einer Chemoresistenz.

10 Beispiel 6 (nach Chemotherapie)

a) Klinische Ausgangssituation

Bei der Patientin handelte es sich um dieselbe, die im Beispiel 5 beschrieben wurde. Aufgrund des gemäß Beispiel 5 gestellten Befundes wurde die Patientin mit einer adjuvanten  
15 Chemotherapie und mit Tamoxifen behandelt. Nach Abschluß der Chemotherapie wurde der Patientin erneut Blut entnommen.

b) Fragestellung

Gab es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten?

20 c) Untersuchungen und Resultate:

Untersuchung	Ergebnis
anti-p53	niedrig
Pan p53	243 pg/ml normal bis 646 grenzwertig bis 786 pathologisch ab 787
c-erb-B2	2610 HNU/ml normal bis 3385 grenzwertig 3386 - 3845 pathologisch >3845
25 p53-Mutation in Tumorzellen	NEGATIV
p53(Exon5)-Mutation	NEGATIV
p53(Exon6)-Mutation	NEGATIV
p53(Exon7)-Mutationen	NEGATIV
p53(Exon8)-Mutationen	NEGATIV
30 erb-B2 nach Tumorzellisolierung	NEGATIV
c-myc nach Tumorzellisolierung	NEGATIV

	CK20-mRNA	NEGATIV
	CEA-mRNA	NEGATIV
	MUC1-mRNA	0.60
	bFGF-mRNA	NEGATIV
5	bFGF-R-mRNA	POSITIV
	VEGF-mRNA	schwach positiv
	VEGF-R1-mRNA	POSITIV
	VEGF-R2-mRNA	NEGATIV
	TIMP3-mRNA	NEGATIV
10	MMP2-mRNA	NEGATIV
	Progesteron-R-mRNA	POSITIV
	EGP-mRNA	232255 (entspricht 100 %)
	GAPDH-mRNA	463040096 (entspricht 100 %)
	EGP-mRNA Fraktion C	0
15	GAPDH-mRNA Fraktion C	203 (entspricht 0,00004 % von Fraktion A)
	MUC1-mRNA Fraktion C	0.00

## d) Bewertung

- 20 Bei der Patientin ließen sich hämatogen zirkulierende Zellen nachweisen, die vom Karzinomtyp sein konnten. Krebszellspezifisch konnten Zellen nachgewiesen werden, welche die krebsspezifische Splice-Variante des Mucin1-Gens verstärkt transkribierten. Die nachgewiesenen Zellen zeigten
- 25 erste Anzeichen einer Metastasierungsfähigkeit; sie exprimierten bFGF-R-, VEGF- und VEGF-R1-mRNA; MMP-2 konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Die im Blut vagabundierenden Zellen waren Progesteron-Rezeptor positiv. Unter den prognostischen Onkoproteinen war anti-p53
- 30 nachweisbar; dieses durch p53-Mutationen reaktive Protein deutete auf eine reduzierte Prognose hin.

## e) Zusammenfassung und Schlußfolgerung:

Insgesamt sprach der Befund für ein noch streuendes Karzinom. Im Vergleich zum Vorbefund (vor der Chemotherapie) lag jedoch

ein deutlich verändertes Bild vor. So war insbesondere MUC1 in der Fraktion C nicht mehr nachzuweisen und in der Fraktion A waren die Marker CK20 und CEA negativ. Dies sprach für einen deutlichen Therapieerfolg.

5

### Beispiel 7

#### a) Klinische Ausgangssituation

Bei der zu untersuchenden Patientin bestand ein Verdacht auf Ovarkarzinom. Es wurde eine Blutprobe entnommen.

#### 10 b) Fragestellung

Gab es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten? Bestand eine Chemoresistenz?

#### c) Untersuchungen und Resultate

15

Untersuchung	Ergebnis
anti-p53	NEGATIV
Pan p53	440 pg/ml normal bis 646 grenzwertig bis 786 pathologisch ab 787
c-erb-B2	2641 HNU/ml normal bis 3385 grenzwertig 3386 - 3845 pathologisch >3845
p53-Mutation in Tumorzellen	NEGATIV
p53(Exon5)-Mutation	NEGATIV
p53(Exon6)-Mutation	NEGATIV
p53(Exon7)-Mutationen	NEGATIV
p53(Exon8)-Mutationen	NEGATIV
erb-B2 nach Tumorzellisolierung	NEGATIV
c-myc nach Tumorzellisolierung	NEGATIV
CK20-mRNA	NEGATIV
CEA-mRNA	NEGATIV
MUC1-mRNA	0.35
bFGF-mRNA	NEGATIV
bFGF-R-mRNA	NEGATIV

30

	VEGF-mRNA	nicht bewertbar
	VEGF-R1-mRNA	NEGATIV
	VEGF-R2-mRNA	NEGATIV
	Progesteron-R-mRNA	schwach positiv
5	MDR1-mRNA	POSITIV
	Topoisomerase II-mRNA	NEGATIV
	MDR1-Efflux-Doxorubicin-Test <sup>1)</sup>	0 %
	MDR1-Pumpe-gp170 <sup>2)</sup>	0 %
	Glutation-S-Transferase-mRNA	POSITIV
10	MRP-mRNA	POSITIV

1) Bemerkung zum Parameter:  
 15 Im Gegensatz zu den Kontrollzellen konnten die Lymphozyten kein Doxorubicin akkumulieren. Damit war die Bestimmung des Effluxes nicht möglich.

2) Bemerkung zum Parameter:  
 20 Gegenüber den positiven Kontrollzellen ließ sich keine Expression der MDR1-Pumpe-gp170 auf den Lymphozyten nachweisen. Die quantitative Analyse ergab folgendes:  
 Unspezifische Antikörper-Bindungskapazität (ABC): 1523  
 25 Spezifische ABC: 4165

#### d) Bewertung

Bei der Patientin ließen sich hämatogen zirkulierende Krebszellen vom Karzinomtyp nachweisen, welche die  
 30 krebsspezifische Splice-Variante des MUC1-Gens verstärkt transskribierten.

Da die Analysen obiger Angiogenesefaktoren negativ ausfiel, konnten keine Zellen nachgewiesen werden, die zur  
 Neoangiogenese, dem funktionellen Zusammenspiel von Endothel-  
 35 und Epithelzellen, befähigt waren. Die zirkulierenden Krebszellen zeigten daher keine Metastasierungsfähigkeit; von der Bildung aktiver Metastasen war nicht auszugehen. Die im Blut zirkulierenden Zellen exprimierten den Progesteron-Rezeptor. Bei der Patientin bestand kein Hinweis auf eine  
 40 Chemoresistenz.

## e) Zusammenfassung und Schlußfolgerung

Insgesamt sprach der Befund möglicherweise für ein Karzinom eines hormonsensitiven Organs.

5 **Beispiel 8:**

## a) Klinische Ausgangssituation

Bei der zu untersuchenden Patientin bestand aufgrund eines suspekten Mammabefundes (walnußgroßer Tumor bei unauffälliger Mammographie) ein Verdacht auf Mammakarzinom. In der Familie  
10 waren drei Fälle von Mamma-Neoplasien, davon zwei bei Patientinnen unter 50 Jahren und ein Fall einer Ovar-Neoplasie bekannt. Es bestand daher eine erbliche Tumor-Disposition. Es wurde eine Blutprobe entnommen.

## b) Fragestellung

15 Gab es in der entnommenen Blutprobe zirkulierende Krebszellen, die Metastasen bilden konnten?

## c) Untersuchungen und Resultate

Untersuchung	Ergebnis
anti-p53	NEGATIV
20 Pan p53	87 pg/ml normal bis 646 grenzwertig bis 786 pathologisch ab 787
c-erb-B2	2540 HNU/ml normal bis 3385 grenzwertig 3386 - 3845 pathologisch >3845
p53-Mutation in Tumorzellen	NEGATIV
p53(Exon5)-Mutation	NEGATIV
p53(Exon6)-Mutation	NEGATIV
25 p53(Exon7)-Mutationen	NEGATIV
p53(Exon8)-Mutationen	NEGATIV
erb-B2 nach Tumorzellisolierung	NEGATIV
c-myc nach Tumorzellisolierung	NEGATIV
CK20-mRNA Fraktion A	POSITIV
30 CEA-mRNA Fraktion A	schwach positiv
MUC1-mRNA Fraktion A	0.86

	bFGF-mRNA Fraktion A	POSITIV 909 entspricht 100% (Fraktion A)
	bFGF-R-mRNA Fraktion A	NEGATIV
	VEGF-mRNA Fraktion A	POSITIV 72437 entspricht 100% (Fraktion A)
	VEGF-R1-mRNA Fraktion A	NEGATIV
5	VEGF-R2-mRNA Fraktion A	NEGATIV
	TIMP3-mRNA Fraktion A	POSITIV
	MMP2-mRNA Fraktion A	schwach positiv
	Progesteron-R-mRNA	NEGATIV
	EGP-mRNA Fraktion A	104097 (entspricht 100 %)
10	GAPDH-mRNA Fraktion A	153350963 (entspricht 100 %)
	CK20-mRNA Fraktion C	NEGATIV
	CEA-mRNA Fraktion C	NEGATIV
	MUC1-mRNA Fraktion C	0,00
	bFGF-mRNA Fraktion C	0,00
15	VEGF-mRNA Fraktion C	1738 (2,4 % bezogen auf Fraktion A)
	TIMP3-mRNA Fraktion C	NEGATIV
	MMP2-mRNA Fraktion C	NEGATIV
	EGP-mRNA Fraktion C	0
20	GAPDH-mRNA Fraktion C	108644 (entspricht 0,00708 % von Fraktion A)

## d) Bewertung

Bei der Patientin ließen sich geringe Mengen an hämatogen zirkulierenden Krebszellen vom Karzinomtyp nachweisen, welche die krebsspezifische Splice-Variante des MUC1-Gens verstärkt transskribierten. Auch die Expression von CK20 und CEA konnte nachgewiesen werden. Diese Expressionscharakteristika sprachen für ein Mammakarzinom. Die zirkulierenden Krebszellen konnten allerdings nicht angereichert werden.

Da die Analysen obiger Angiogenesefaktoren teilweise positiv ausfiel (Expression von bFGF und VEGF), konnten Zellen

nachgewiesen werden, die zur Neoangiogenese, dem funktionellen Zusammenspiel von Endothel- und Epithelzellen, befähigt waren. Die zirkulierenden Krebszellen zeigten daher bereits Anzeichen einer Metastasierungsfähigkeit. Dafür

- 5 sprach auch die Expression des MMP2-Gens. Die Bildung aktiver Metastasen war daher sehr wahrscheinlich. Der Progesteron-Rezeptor wurde von den im Blut zirkulierenden Zellen nicht exprimiert.

e) Zusammenfassung und Schlußfolgerung

- 10 Insgesamt sprach der Befund für ein streuendes Karzinom. Die zirkulierenden Zellen stammten aus der Mamma.



nachgewiesen werden, die zur Neoangiogenese, dem funktionellen Zusammenspiel von Endothel- und Epithelzellen, befähigt waren. Die zirkulierenden Krebszellen zeigten daher bereits Anzeichen einer Metastasierungsfähigkeit. Dafür

- 5 sprach auch die Expression des MMP2-Gens. Die Bildung aktiver Metastasen war daher sehr wahrscheinlich. Der Progesteron-Rezeptor wurde von den im Blut zirkulierenden Zellen nicht exprimiert.

e) Zusammenfassung und Schlußfolgerung

- 10 Insgesamt sprach der Befund für ein streuendes Karzinom. Die zirkulierenden Zellen stammten aus der Mamma.

**GLOSSAR****AFP (Alpha-Fetoprotein)**

AFP ist das Hauptplasma Protein im Fetus. Im Adulten ist die

- 5 Expression von AFP sehr gering, es sei denn es liegt ein Tumor, wie ein Hepatom oder ein Teratom, vor.

Lit.: Gibbs et al.; Biochemistry 26: 1332-1343, 1987.

 **$\beta$ -Aktin**

- 10 Lit.: Pollard, T.D. and Cooper, J.A.; Ann. Rev. Biochem. 55, 987 ff, 1986.

**Albumin (ALB)**

Albumin dient zur Identifizierung von im Blut zirkulierenden

- 15 Hepatomzellen.

Lit.: Minghetti et al.; J. Biol. Chem. 261: 6747-6757, 1986.

**AR (Androgen-Rezeptor)**

Synonyme: Dihydrotestosteron-Rezeptor, Testosteron-Rezeptor,

- 20 TFM

Prostatakarzinomzellen sind von der wachstumsstimulierenden Wirkung des AR abhängig. In Prostatakarzinomen konnten Mutationen des Androgen-Rezeptors nachgewiesen werden, die teilweise zu einem konstitutiv aktiven Rezeptor führen.

- 25 Lit.: Lubahn et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(11): 9534-9538, 1989.

**BA46 (Breast Epithelial Antigen 46)**

Synonym: Human Milk Fat Globule Protein

- 30 Das Glykoprotein BA-46 wird von Mammakarzinomen exprimiert und wurde erfolgreich als Ziel experimenteller Radio-immunotherapien benutzt.

Lit.: Couto et al.; DNA Cell Biol. 15: 281-286, 1996.

- 35 **Basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF)**

Synonym: FGF-2

Bei vielen Tumorarten wird bFGF überexprimiert und kann daher als ein Faktor für die Metastasierungsfähigkeit angesehen

werden.

**Lit.:** Abraham et al.; EMBO J. 5: 2523-2528, 1986.

#### **BAX**

- 5 Das bcl-2-Produkt heterodimerisiert in-vivo mit einem konservierten Homologen, dem BAX, wodurch der programmierte Zelltod beschleunigt wird.

**Lit.:** Tsujimoto Y. and Croce C.M.; PNAS, 83 (14), 5214-5218, 1986.

10

#### **bcl-2**

Das bcl-2-Gen wurde in follikulären Non-Hodgkin-Lymphomen (B-Zell-Lymphomen) entdeckt. BCL-2 kann die Apoptose blockieren.

- 15 **Lit.:** Tsujimoto Y. and Croce C.M.; PNAS, 83 (14), 5214-5218, 1986.

#### **BRCA1**

- Das BRCA1-Gen ist ein Tumorsuppressor-Gen. Bei 5-10% der Patientinnen mit Brustkrebs besteht eine erbliche Disposition, womit häufig auch eine Disposition für Ovarkarzinome verbunden ist. Mutationen des BRCA1-Gens stehen in Zusammenhang mit 45% der Mammakarzinome mit erblicher Komponente. Mutationen im BRCA1-Gen betreffen auch Ovarkarzinome.

- 25 **Lit.:** Smith T.M., et al.; Genome Res. 6, 1029-1049, 1996.

#### **BRCA2**

- Das BRCA1-Gen ist ein Tumorsuppressor-Gen. Mutationen dieses Gens werden für einen hohen Anteil früh entstehender erblicher Brusttumoren verantwortlich gemacht.

- 30 **Lit.:** Lancaster J.M., et al.; Nature Genet. 13, 238-240, 1996.

#### **Calcitonin**

- 35 Calcitonin (32 Aminosäuren) wird wie "Calcitonin gene-related peptide (CGRP; 37 Aminosäuren)" von einem Gen kodiert, dem calc-1. Calcitonin kann das Wachstum einer gastrischen Karzinomzelllinie hemmen und das Neurohormon CGRP kann als

autokriner Wachstumsfaktor für murine Karzinomzelllinien fungieren.

Lit.: Adema and Baas; BBRC 178: 985-992, 1991.

5    **CC10 (Clara cell 10 kD Protein)**

CC10 wird nur in Alveolarepithelzellen Typ 2 und in Clara-Zellen des Lungenepithels exprimiert und ist an der Bildung der "epithelial lining fluid" beteiligt.

Lit.: Am. L. Physiol. 268: L565 (1995).

10

**CCK (Cholecystokinin)**

CCK ist ein Gehirn- und Darmhormon. CCK wird zudem von einigen Sarkom-Neuroepitheliomas-Zelllinien exprimiert.

Lit.: Friedman, J.M. et al.; PNAS 89: 5819-5823, 1992.

15

**CD44**

Synonyme: Hermes-Antigen, Pgp-1

Das CD44-Glykoprotein ist ein Zelladhäsionsmolekül. Bestimmte Splicevarianten von CD44 spielen eine Rolle im Metastasierungsprozeß von Tumoren.

20

Lit.: Matsumura, Y. and Tarin, D.; The Lancet 340, 1053-1058, 1992.

**CEA (carcinoembryonic antigen)**

25    Synonym: CD66e

CEA wird in gastrointestinalen und colorectalen Karzinomen, aber auch in verschiedenen soliden Tumoren, wie Mammakarzinomen, im fetalen Colon, nicht aber in normalen Lymphozyten exprimiert wird. Wegen dieses Expressionsprofils dient der Nachweis CEA-positiver Zellen im Blut zur Diagnose zirkulierender Tumorzellen. Weiterhin sind CEA-Immunoassays wichtige Diagnoseverfahren bei der Beobachtung von Krebs-

30

Patienten, besonders im Fall von Colonkarzinomen.  
Lit.: Zimmermann et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 2960-2964, 1987.

35

**CK20 (Cytokeratin 20)**

Maligne Zellen behalten in der Regel das Muster an Cyto-

- keratinen und dieses kann demgemäß zur Rücklokalisierung der Tumorzellen auf ein Epithel benutzt werden. Da CK20 nicht von Zellen des peripheren Blutes exprimiert wird, sondern hauptsächlich von Zellen des Gastrointestinaltraktes, dient
- 5 dieses Cytokeratin zum Nachweis im Blut zirkulierender Tumorzellen dieses Ursprungs.

Lit.: Moll et al.; Differentiation 63: 75-93, 1993;  
Burchill et al.; British Journal of Cancer 71:278-281, 1995.

10 **Cyclin A, B(1), D1, D2, D3, und E**

Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) sind essentiell für die Kontrolle des Zellzyklus eukaryotischer Zellen. Die Messung der Cycline korreliert mit dem Zellzyklus.

- Lit.: Motokura T., et al.; J. Biol. Chem. 1992 Oct 5;  
15 267(28): 20412-5;  
Lees E., et al.; Genes-Dev. 1992 Oct; 6(10): 1874-85.

**Cyclin G**

- Cyclin G1 und Cyclin G2 stellen zwei erst kürzlich
- 20 identifizierte Cycline dar, welche im Zellzyklus eine Rolle spielen.

Lit.: Horne M.C., et al.; J. Biol. Chem. 1996 Mar 15;  
271(11): 6050-61.

25 **DCC**

In colorectalen Tumoren sind häufig Sequenzen aus Chromosom 18 deletiert (DCC = Deleted in colorectal carcinomas). Die Expression des DCC-Gens ist in den meisten colorectalen Karzinomen stark reduziert. Der Verlust der 18q-Region ist

30 mit einer schlechten Prognose verbunden. Der Status des DCC-Gens kann mittels Mikrosatelliten-Markern und PCR aus Formalin-fixiertem Material bestimmt werden.

Lit.: Frank C.J., et al.; Cancer Res. 57, (5), 824-827, 1997.

35 **DPC4**

Die Bezeichnung bedeutet "deleted in pancreatic carcinoma". Etwa 90% der humanen Pankreaskarzinome zeigen einen Allelverlust auf Chromosom 18. Es handelt sich um ein Tumor-

suppressor-Gen. Auch in Brust- und Ovarkarzinomen wurden Änderungen des DPC4-Gens entdeckt.

Lit.: Hahn S.A., et al.; Science 271, 350-354, 1996.

5 **E-Cadherin**

**Catenin ( $\alpha$ - und  $\beta$ -)**

E-Cadherin ist, in Verbindung mit assoziierten Cateninen ( $\alpha$ -Catenin;  $\beta$ -Catenin) für die Organogenese und Histogenese von Epithelgewebe wichtig und spielt im Metastasierungsprozeß von Karzinomen eine zentrale Rolle.

Lit.: Aberle H., et al.; J. Cell. Biochem. 1996 Jun 15; 61(4): 514-23.

**EGF (Epidermaler Wachstumsfaktor)**

15 Synonyme: HMGF (human milk growth factor); PGF (prostatic growth factor); Urogastron

EGF ist an der embryonalen Entwicklung beteiligt (ektodermale, mesodermale und endodermale Zellen) und kontrolliert/stimuliert die Proliferation von epidermalen und epithelialen Zellen in-vitro. EGF kann ebenfalls als angiogener und chemotaktischer Faktor wirken.

Lit.: Carpenter: EGF; Curr. Opin. Cell. Biol. 5: 261-264, 1993.

25 **EGF-R (EGF-Rezeptor)**

Synonym: SA-7 (species antigen 7)

In einigen humanen Tumoren wird der EGF-R überexprimiert, was auch mit der Tumoraggressivität korreliert; eine schlechte Prognose ergibt sich aus der Coexpression des EGF-R mit entweder c-erb-B2 oder TGF-alpha.

Lit.: Ibelgauf: Dictionary of cytokines, VCH, 1994.

**EGP (Epitheliales Glykoprotein)**

Synonyme: GA733-2; 17-1A-Antigen; KS1/4

35 Das epitheliale Glykoprotein kann als epithelspezifischer Marker zum Nachweis von Karzinomen dienen.

Lit.: Simon, B. et al.; PNAS 87: 2755-2759, 1990; Szala, S. et al.; PNAS 87: 3542-3546, 1990.

**Enteroglucagon**

Synonyme: EG, Glucagon 37

Enteroglucagon ist ein Peptid, welches von den Zellen des Jejunum-Ileums produziert wird.

- 5 Lit.: Bell, G.I. et al.; Nature 304: 368-371, 1983.

**erb-B**

Das erb-B- Gen kodiert für den Rezeptor (EGF-R) des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF). Dieses Gen ist in etwa 50% der fortgeschrittenen humanen Glioblastomen amplifiziert.

- 10 Lit.: Haley J., et al.; Oncogene Res. 1, 375-396, 1987.

**erb-B2**

Synonyme: c-erb-B2; avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2; NGL (neuroblastoma or glioblastoma-derived); neu; tyrosine kinase-type cell surface receptor HER2; TKR1

- 15 Erb-B2 kodiert ein Tumorentigen, P185, welches serologisch mit dem Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) verwandt ist. Eine Überexpression konvertiert das Gen für einen normalen Wachstumsfaktor-Rezeptor, erb-B2, in ein Onkogen. Eine Amplifikation von erb-B2 wird in Adenokarzinomen, bei Brust- und Ovarkrebs beobachtet. Erb-B2 ist außerdem bei der Entwicklung von akuter promyeloischer Leukämie (APL)
- 20 involviert, da das Gen im Band q21.1 von Chromosom 17 lokalisiert ist, wo sich auch der Bruchpunkt der Translokation zwischen Chromosom 15 und 17 befindet (t15:17).
- 25 Lit.: Slamon et al.; Science 244: 707-712, 1989.

30 **FAP (APC)**

Das Gen der familiären adenomatösen Polyposis coli, einer autosomal-dominanten Erkrankung, ist das fap.

Lit.: Groden j. et al.; Cell 66: 589-0, 1991.

35 **FAS-R; FAS-L (CD95, CD95-L)**

FAS gehört in die Gruppe der Apoptose-auslösenden Faktoren.

Lit.: Alderson M.R.; J. Exp. Med. 181, (1), 71-77, 1995;

Itoh N.; Cell 66, (6), 233-243, 1991.

**FGF-Rezeptoren**

Synonyme: fms-like tyrosine kinase-2; FLT2; FMS-like gene; FLG (bFGF-R1); K-SAM, bek (FGF-R2)

- Unterschiedliche Expression und alternatives Splicen können  
5 in der malignen Progression von Tumoren kritisch sein.

Lit.: Yamaguchi et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 484-488, 1994.

**c-fos**

- 10 Den c-fos- und c-jun-Genen kommt ein zentraler Stellenwert im Rahmen der Wachstumsregulation zu.

Lit.: Ekstrand A.J., et al.; Exp. Cell. Res. 169. 262-266, 1987.

**15 GADD45**

Gadd45 ist ein Wachstumsarrest- und ein durch DNA-Schäden induziertes Gen, welches durch das p53-Tumorsuppressor-Gen reguliert wird.

- Lit.: Constance, C.M. et al.; Mol-Cell-Biol. 1996 Jul; 16(7):  
20 3878-83  
Crawford, D.R. et al.; Arch-Biochem-Biophys. 1996 May 15;  
329(2): 137-44.

**GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase)**

- 25 Dieses Gen wird in allen Zellen exprimiert. Die Expression dieses Gens korreliert mit der Zellzahl und dient zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der cDNA.

Lit.: Allen, R.W. et al.; J. Biol. Chem. 262 (2), 649-653, 1987.

30

**Gastrin (GAS)**

Gastrin wird vornehmlich von mucosalen Zellen des Magens und den D-Zellen im Pankreas produziert.

Lit.: Boel, E. et al.; PNAS 80: 2866-2869, 1983.

35

**GD-AIF (Glioma-Derived Angiogenesis Inhibitory Factor)**

Das GD-AIF gehört ebenso wie Thrombospondin und Angiostatin zu den endogenen Negativ-Regulatoren der Angiogenese. Das



Ausmaß, in dem die negativen Regulatoren während der Umschaltphase auf den angiogenischen Phenotyp der Tumorgenese abnehmen, entscheidet darüber, ob ein Primärtumor langsam oder schnell wächst und ob Metastasen gebildet werden.

- 5 Lit.: Folkman J.; Nat. Med. 1 (1995) 27-31.

#### **GIP (Gastric Inhibitory Polypeptide)**

Synonym: Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide

- 10 Produziert wird dieses Hormon vornehmlich von Zellen des oberen Dünndarms.

Lit.: Inagaki, N. et al.; Molec. Endocr. 3: 1014-1021, 1989.

#### **GST-pi (Glutathion-S-Transferase-pi)**

- 15 GST-pi kodiert für ein detoxifizierendes Enzym und spielt daher bei der Entwicklung von chemoresistenten Tumoren eine Rolle. Nach Chemotherapie konnte eine Steigerung der Expression in Tumoren beobachtet werden, was mit einer ungünstigen Prognose und Chemoresistenz einhergeht.

Lit.: Morrow et al.; Gene 75: 3-11, 1989.

20

#### **Granzym**

Die Hauptfunktion der Granzyme liegt in der Lyse von Tumorzellen und virusinfizierten Zellen durch eine apoptotische Fragmentierung der DNA.

- 25 Lit.: Kummer, J.A. et al.; Kidney Int. 47: 70-77 (1995).

#### **hCG (Humanes Chorionisches Gonadotropin)**

Die  $\beta$ -Untereinheit des hCG dient als Marker für Keimbahntumoren und Chorionkarzinome und die Detektion der hCG-mRNA mittels RT-PCR ist auch in der Diagnostik metastasierender Mammakarzinome und maligner Melanome nützlich

30

Lit.: Doi F. et al; Int. J. Cancer 65 (1996) 454-459.

#### **HIC-1 (hypermethylated in cancer)**

Das HIC-1 gilt als mögliches Tumorsuppressor-Genprodukt. In Tumorzellen, in denen es hypermethyliert ist, erfolgt eine Unterexpression.

35

Lit.: Wales M. M., et al.; Nat.Med. 1 (1995) 570-577.

#### **HSP70**

Hitzeschockproteine wie HSP70 können bei "Escape-Mechanismen"  
5 von Tumorzellen eine Rolle spielen.

Lit.: Kaur J. and Ralhan R.; 63(6): 774-9.

#### **hTG (humanes Thyreoglobulin)**

hTG ist ein Schilddrüsenprotein. Es wurden vier Transkripte  
10 identifiziert, welche die Folge alternativen Splicens sind.

Lit.: Bertaux et al.; Gene 156: 297-301, 1995.

#### **ICAM (Interzelluläre Adhäsionsmoleküle)**

Synonyme: ICAM-1 (CD54, ICAM1-1); ICAM-2 (CD102); ICAM-3  
15 Die ICAM's-1, -2, und -3 sind Zelloberflächenmoleküle und  
dienen als Liganden der Leukozytenintegrine.

#### **IGF (Insulin-like growth factor)**

Synonyme: MSA (multiplication-stimulating activity);  
20 Somatomedin; NSILA (non-suppressible insulin-like activity);  
SF (sulfation factor), SFA, SGF (Skeletal growth factor), SMP  
IGF's wirken als mitogene, autokrine und angiogene Faktoren.  
Lit.: Cohick and Clemmons; Annual Review of Physiology 55:  
131-153, 1993.

25

#### **IGF-BP3 (Insulin-like growth factor binding protein 3)**

Synonyme: IGBP; IBP; BP-53; growth hormone dependent binding  
protein; binding protein 29

IGF-BP3 fungiert als Wachstumsinhibitor.

30 Lit.: Lamson; Growth factors 5: 19-28, 1991.

#### **Integrine**

Integrine sind heterodimere Zelloberflächenantigene, die an  
Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen beteiligt sind.

35 Lit.: Vith International Human Leukocyte Differentiation  
Antigen Workshop and Conference, Kobe (Japan), November 1996.

**Interferon-gamma**

Synonyme: Immune interferon; type 2 interferon; T interferon; antigen-induced interferon; mitogen-induced interferon; ph2-labile interferon

- 5 **Lit.:** Gray et al.; Nature 295: 503-508, 1982;  
Ibelgaufits: Dictionary of cytokines. VCH 1994.

**LOH's**

- Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ist ein kritischer  
10 Schritt in der Tumorentstehung. Häufige Mechanismen sind  
sowohl inaktivierende Mutationen, sowie der genomische  
Verlust des gesamten Gens, oder Teilen des Gens. Der  
genomische Verlust von Chromosomenabschnitten kann durch den  
"Verlust der Heterozygotie" (Loss of Heterozygosity = LOH)  
15 experimentell nachvollzogen werden. Dabei finden sich im  
Normalgewebe eines Patienten beide Allele des Tumorsuppres-  
sorgens, während im Tumor nur noch ein Allel nachweisbar ist.  
Zur Identifizierung der zwei Allele dienen im oder in der  
Nähe des Tumorsuppressorgens lokalisierte hochpolymorphe  
20 chromosomale Bereiche (Mikrosatelliten repeats), die durch  
eine PCR amplifiziert werden. Hierbei handelt es sich um  
Wiederholungen kurzer Nucleotidabfolgen (zb. CA-Repeats, CGG  
Repeats), wobei die Kopienzahl unterschiedlich ist und damit  
das in der PCR amplifizierte Produkt unterschiedliche Längen  
25 aufweist.

**L32**

Aufgrund der ubiquitären Expression von L32 eignet es sich  
als Zielgen für Quantifizierungen.

- 30 **Lit.:** Young, J.A. and Trowsdale, J.; Nucleic Acids Res. 13  
(24), 8883-8891, 1985.

**LRP**

Synonyme: Protein-Tyrosinephosphatase; Alpha-Polypeptide;

- 35 PTPRA; PTPA

Lrp kodiert für eine ubiquitär exprimierte Protein-Tyrosin-  
Kinase.

**Lit.:** Jirik et al.; FEBS Lett. 273: 239-242, 1990.

**MAGE1 (Melanoma associated antigen-1)**

Synonym: MZ2-E

Das MAGE1-Gen kodiert für ein Antigen auf der Oberfläche von Melanom-Zellen. Während MAGE1 auf der RNA-Ebene in vielen Tumoren auf hohem Level nachweisbar ist, findet sich die RNA nicht in normalen Geweben mit der Ausnahme von Hoden und Ovar. Dieses Genprodukt ist also hervorragend als Marker für zirkulierende Tumorzellen, insbesondere Melanom-Zellen, geeignet.

10 Lit.: De Plaen et al.; Immunogenetics 40: 360-369, 1994.

**MAGE3 (Melanoma associated antigen-3)**

Das MAGE3-kodierende Gen wird in etwa 69% der Melanome transkribiert. Da es bisher nur in Tumorgewebe und bis auf Hoden in keinem Normalgewebe gefunden wurde, eignet sich dieses Gen als Marker für zirkulierende Melanom-Zellen.

Lit.: Gaugler et al.; J. Exp. Med. 179: 921-930, 1994.

**Maspin**

20 Bei Maspin handelt es sich um ein Tumorsuppressor-Gen. Defekte dieses Gens finden sich insbesondere in Mammakarzinomzellen.

Lit.: Luppi et al.; Annals of Oncol. 7: 619-624, 1996.

**mdm2**

Der onkogene Effekt einer gesteigerten MDM2-Aktivität macht sich in einer Inaktiveriung der durch p53 induzierten Wachstumsinhibition bemerkbar. In Übereinstimmung dazu findet man in humanen Tumoren eine Überexpression von mdm2.

30 Lit.: Zaubermann et al.; Nucleic Acids Res. 23: 2584-2592, 1995.

**B2-Mikroglobulin**

B2-Mikroglobulin wird auf allen kernhaltigen Zellen der Vertebraten exprimiert.

35 Lit.: Williams, A.F. and Barclay, A.N.; Annu. Rev. Immunol. 6, 381; 1988.

**MLH1**

Synonyme: FCC2; COCA2; HNPCC (Hereditary Nonpolyposis colorectal cancer Type 2)

- 5 Mutationen MLH1-Gen sind für etwa 30% einer erblichen Form des Colonkarzinoms (hereditary nonpolyposis colon cancer = HNPCC) verantwortlich. Etwa 60% der HNPCC-Fälle werden aber durch Mutationen im MSH2-Gen auf Chromosom 2 verursacht. Es wurden zwei weitere humane Gene, die zu MutL homolog sind, isoliert: pms-1 und pms-2. Diese sind allerdings seltener als  
10 msh2 und mlh1 an der Entstehung von Tumoren beteiligt.  
Lit.: Bellacosa et al.; Am. J. Med. Genet. 62: 353-364, 1996.

**MMP (Metalloproteinase)**

- 15 MMP's sind  $Zn^{2+}$ -bindene Endopeptidasen, die Komponenten der extrazellulären Matrix abbauen. Sie sind an der Angiogenese und der Tumordinvasion beteiligt. Es existieren mind. 11 MMP's.

- Eine Überexpression von Metalloproteinasen fördert die Invasion und Metastase von Tumoren. Einige dieser Metalloproteinasen werden von Tumorzellen sowohl auf der Zelloberfläche als auch auf mRNA-Ebene verstärkt exprimiert.  
20 Lit.: Freije et al.; J. Biol. Chem. 269: 16766-16773, 1994; Sato et al.; Nature 370: 61-65, 1994.

**25 Motilin (MLN)**

- Motilin ist ein von Zellen des Dünndarms produziertes Hormon.  
Lit.: Daikh, D.I et al.; DNA 8: 615-621; 1989.

**MRP1 (Multidrug Resistance-Associated Protein-1)**

- 30 Das MRP-Gen kodiert für eine in der Plasmamembran lokalisierte Chemotherapeutika-Efflux-Pumpe mit Ähnlichkeiten zur "ATP-binding cassette"-Superfamilie von Transportsystemen, zu der auch MDR1 und der "cystic fibrosis transmembran conductance regulator" gehört. In einer chemoresistenten  
35 Zelllinie des kleinzelligen Lungenkarzinoms konnte eine MDR1-Überexpression, die auf eine genomische Amplifikation des Gens zurückzuführen war, nachgewiesen werden.  
Lit.: Cole et al.; Science 258: 1650-1654, 1992.

**MSH2**

Dieses Gen spielt bei Tumoren eine Rolle, die sich bei Patienten mit hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) entwickeln. MSH2-Mutationen fanden sich in 21% der betroffenen HNPCC-Familien.

Lit.: Fishel R., et al.; Science 266, 1403-1405, 1994.

**MUC1 (Mucin-1)**

Synonym: urinary

Das MUC1-Gen kodiert eine transmembranes Glykoprotein, das von Tumorzellen zum Schutz gegenüber cytotoxischen Immunzellen und um die Metastasierung voranzutreiben gebildet wird. MUC1 wird von normalen Geweben und Zellen, aber auch von malignen Zellen und Geweben synthetisiert. Z.B. zeigen Brustkrebs-, Pankreaskrebs- und Adenokarzinomzellen eine Überexpression des MUC1-Proteins; außerdem wird bei einigen Krebsarten eine tumorspezifische Splicevariante neben der "normalen" Variante detektiert.

Lit.: Weiss et al.; Int. J. Cancer 66: 55-59, 1996.

**Muc18**

Muc18 kodiert für Glykoprotein, dessen Expression auf fortgeschrittene primäre und metastasierende Melanome sowie auf Zelllinien der neuroektodermalen Linie beschränkt ist. In etwa 80% der Melanome wird eine mRNA-Expression gefunden, wobei die Expression mit dem Metastasierungszustand der Zellen korreliert. Die Anwesenheit von Zellen im Blut, die diese mRNA exprimieren, ist ein guter Hinweis auf zirkulierende Tumorzellen eines fortgeschrittenen oder metastasierenden Melanoms.

Lit.: Lehmann et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9891-9895, 1989.

**myc**

Synonym: Proto-Onkogen homolog zum myelozytomatoesen Virus; c-myc

Die Amplifikation von c-myc wird in fortgeschrittenen und in aggressiven, primären Tumoren gefunden.

**Lit.:** Adams et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 1982-1986, 1983.

#### **N-CoR**

- 5 N-CoR stellt ein Co-Repressorprotein für den Retinsäurerezeptor  $\beta$  dar.

**Lit.:** Soderstrom et al.; Mol. Endocrinol. 11:682 (1997).

#### **Neurotensin (NTS)**

- 10 Neurotensin ist ein kleines in den catecholaminhaltigen Neuronen lokalisiertes Neuropeptid.

**Lit.:** Bean, A.J. et al.; Neuroscience 50: 259-268, 1992.

#### **NF-1**

- 15 Bei dem NF1-Gen handelt es sich um einen Tumorsuppressor-Gen. Das Produkt des Neurofibromatose-1-Gens ist das Neurofibromin oder NF1-GAP. In 10 Familien mit Neurofibromatose (Morbus von Recklinghausen) wurden NF-1-Mutationen gefunden.

**Lit.:** Marchuk D.A., et al.; Genomics 11, 931-940, 1991.

20

#### **NF-2**

Synonym: merlin

Defekte des NF-2-Tumorsuppressor-Gens wurden bei Neurofibromatose Typ II, einer erblichen malignen Erkrankung mit bilateralen Tumoren des 8. cranialen Nerven, Neurofibromen, Meningiomen, Gliomen oder Schwannomen und auch bei sporadischen Meningiomen, Schwannomen und darüber hinaus bei Melanomen und Mammakarzinomen gefunden.

**Lit.:** Trofatter et al.; Cell 72: 791-800, 1993.

30

#### **nm23**

Das nm23-H1-Gen stellt einen potentiellen Metastasen-suppressor dar. Die Expression verhält sich negativ proportional zur Ausbildung von Lymphknotenmetastasen.

- 35 **Lit.:** Royds JA., et al.; J. Natl. Cancer Inst. 85, 727-31, 1993.

**ÖR (Östrogen-Rezeptor)**

Synonym: ER

Neben seiner Funktion als wichtiger Regulator von Wachstum und Differenzierung der Brustdrüse und des weiblichen

- 5 Reproduktionstraktes spielt der Östrogenrezeptor in der Entwicklung von Mammakarzinomen eine Rolle. Der Gehalt eines Tumors an Östrogen- und Progesteronrezeptor ist somit ein wichtiger prognostischer Marker für das Anschlagen der endokrinen Therapie.
- 10 Vom Östrogenrezeptor wurden verschiedene Splice-Varianten beschrieben, denen eine Funktion bei der Tumorentstehung bzw. Metastasierung zugeschrieben wird. So wurde unter anderem in Brustkrebszelllinien und Tumoren eine Variante des Östrogenrezeptors gefunden, dem das Exon 5 fehlt.
- 15 **Lit.:** Greene et al.; Science 231: 1150-1154, 1986.

**P-Glykoprotein (MDR1)**

Synonyme: PGY-1; MDR1; GP170 Doxorubicin Resistance Gene; Multidrug Resistance Gene

- 20 Das mdr1-Gen kodiert für eine in der apikalen Membran lokalisierte Efflux-Pumpe für Cytostatika. Bei der Behandlung von Tumoren mit Chemotherapeutika tritt oft eine "multi drug resistance" gegen viele, strukturell verschiedene Therapeu-
- 25 Chemotherapeutika eine Amplifikation des mdr1-Lokus beobachtet werden. In Zelllinien mit bestehender Chemoresistenz wurde eine gesteigerte Expression dieses Gens gefunden.
- Lit.:** Gros et al.; Cell 47: 371-380, 1986.

**p16**

Synonyme: p16(INK4) oder CDKN2; MTS1

- Mit P16 wird der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor bezeichnet. Charakteristisch für mts1 sind Deletionen in einer Vielzahl von Tumoren. In Melanomen sind sowohl De-
- 35 tionen als auch Mutationen dieses Gens entdeckt worden. Die Häufigkeit von Deletionen des CDKN2-Gens in Tumorzellen weist auf ein Tumorsuppressor-Gen hin.

**Lit.:** Stone S., et al.; Cancer Res. 55, 2988-2994, 1995.



**p21**

Das P21 betrifft den humanen Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor.

Lit.: Harper J.W., et al.; Cell 75 (4), 805-16, 1993.

5

**p53**

Bei Menschen gehören Mutationen im p53-Gen zu den häufigsten genetischen Veränderungen in bösartigen Tumoren. In der Mehrzahl dieser Tumoren findet man den Verlust eines Allels des p53-Gens (Mammakarzinom (32-64%), Ovarialkarzinom (44-66%); Magenkarzinom (>60%); Blasenkarzinom (38-58%); Pan-kreaskarzinom (70%); Lungenkarzinom (20%); Prostatakarzinom (59%); Cervixkarzinom (50%)). Die Mutationen finden sich über die gesamte Länge des Proteins verteilt, wobei es eine Häufung in den Exonen 5 bis 8 gibt und hierbei noch einige Exone vielfach betroffen sind (Codons 175, 245, 248, 249, 273). Die Frequenz dieser Hotspotmutationen ist je nach Ursprungsorgan des Tumors unterschiedlich. Mutationen im Codon 175 finden sich z.B. in 6% der Mammakarzinome, 14% der Kolorektaltumore und 4% der Ovarialkarzinome. Es handelt es sich fast ausschließlich um Punktmutationen, die in einem weiten Bereich des Gens vorkommen.

Lit.: Levine A.J.; Nature 351, 453, 1991.

25 **PDGF (Platelet-derived growth factor)**

Synonyme: FDGF; GDGF; GDGF-1; GDGF-2; GSM; MDF; MDGF; ODGF; T47D factor

PDGF ist ein lokaler, autokriner und parakriner, chemotaktisch wirkender Wachstumsfaktor, potenter Vasokonstriktor und Angiogenesefaktor.

Lit.: Westermarck und Sorg: Biology of platelet-derived growth factor. Karger, Basel 1993.

**Peptid YY**35 

Synonym: PYY

PYY wird endokrin von Zellen des Dünndarms, des Colons und des Pankreas synthetisiert.

Lit.: Hort, Y. et al.; Genomics 26: 77-83, 1995.

**Perforin-1**

Synonyme: Cytolysin; C9-related protein; pore-forming protein; PFP

Perforin-1 gehört zu einer Klasse von cytolytischen

- 5 Proteinen, welche die Membranen von Zielzellen permeabilisieren.

Lit.: Ojcius und Young; TIBS 16: 225-229, 1991.

**PR (Progesteron-Rezeptor)**

- 10 Synonym: PGR

Ein hoher Gehalt an Progesteron-Rezeptor in einem Mammakarzinom ist ein prognostischer Marker für das Ansprechen einer endokrinen Therapie und längeres Überleben. In Übereinstimmung damit hat Progesteron eine schützende Wirkung

15 gegenüber Brustkrebs. Die Analyse des Progesteron-Rezeptors in Mammakarzinomen ist besonders interessant, da indirekt auch die Anwesenheit des Östrogen-Rezeptor bestimmt werden kann.

Lit.: Misrahi et al.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 143:

- 20 740-748, 1987.

**PSM (Prostata-spezifisches Membranantigen)**

Normale und neoplastische Prostatazellen exprimieren PSM.

Lit.: Israeli et al.; Cancer Res. 53: 227-230, 1993.

25

**PSA (Prostate-spezifisches Antigen)**

Synonym: APS

Der PSA-Spiegel wird in Radioimmunoassays zur Diagnose und Überwachung von Prostatakarzinomen gemessen.

- 30 Lit.: Lundwall et al.; FEBS Lett. 214: 317-322, 1987.

**Ras**

Die zellulären Gene der ras-Gen-Familie werden nach den entsprechenden retroviralen Onkogenen bezeichnet. Ihre Namen

35 sind: c-Harvey-ras (c-H-ras), c-Kirsten-ras (c-K-ras) und N-ras (in Neuroblastomen entdeckt).

Mutationen in den Kodons 12, 13 und 61 finden sich sowohl in soliden als auch hämopoetische Tumoren. RAS-Mutationen können

häufig in Pankreas-, Schilddrüsen- und colorectalen Karzinomen nachgewiesen werden. Die Mehrzahl der Mutationen in colorectalen Tumoren sind G-A- Transsitionen, was Rückschlüsse auf alkylierende Agenzien zuläßt.

- 5 Lit.: Bos J.L.; Cancer Res., 49, 4682-9, 1989.

#### **RB (Retinoblastom)**

Der Verlust oder die Inaktivierung des RB-Gens ist für die Entstehung von Retinoblastomen entscheidend. Der Verlust der Funktion des Gens in beiden Allelen führt zur Tumorentstehung. Mikrosatelliten und RFLP können bei familiären Retinoblastom für DNA-Diagnostik verwendet werden.

Lit.: Friend S.H., et al.; PNAS 84, (24) 9059-63, 1987.

#### 15 **RET**

Das RET-Onkogen ist häufig in papillären Schilddrüsenkarzinomen rearrangiert und mit einem anderen Gen rekombiniert. Bei Patienten mit multipler endokriner Neoplasie vom Typ MEN 2A als auch bei Patienten mit familiärem Schilddrüsenkarzinom (FMTC) wurden zu einem hohen Prozentsatz Keimbahnmutationen des RET-Onkogens nachgewiesen.

Lit.: Viglietto-G et al.; Oncogene 1995 Sep 21, 11(6): 1207-10.

25

#### **SCCA-1 (Squamous Cell Carcinoma Antigen-1)**

Das Protein SCCA-1 wurde aus einem metastatischen Cervix-"Squamous-Cell"-Karzinom isoliert. SCCA-1 wird als Marker für Plattenepithelkarzinome insbesondere der Cervix, des Halses und Nackens, der Lunge und des Ösophagus benutzt, wobei die Menge des Antigens im Blut mit dem Verlauf korreliert.

Lit.: Schneider et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 3147-3151, 1995.

#### 35 **P-, L- und E-Selectin**

Selectine sind transmembrane Glykoproteine, die auf verschiedenen Zelltypen exprimiert werden, wie Plättchen (P-Selectin); Leukozyten (L-Selectin) und Endothelzellen (E- und

P-Selectin). Das Expressionsmuster der Selectine und deren Liganden auf Zellen läßt Rückschlüsse auf das Rezirkulationsverhalten der entsprechenden Zelle zu.

Lit.: Springer, T.A. et al.; Cell 76: 301-314, 1994.

5

#### **SF (Scatter-Faktor)**

Synonym: Hepatocyte growth factor (HGF)

SF wird hauptsächlich von mesenchymalen Zellen, Stroma und Fibroblasten exprimiert und ist ein potenter Angiogenese- und

10 Motilitätsfaktor, der als autokriner Faktor von Tumorzellen ihre Invasivität und die Tumorgenese vorantreiben kann.

Lit.: Nakamura et al.; Nature 342: 440-443, 1989;

Bellusci et al.; Oncogene 9: 1091-1099, 1994.

#### **15 SF-Rezeptor c-met**

Synonyme: Proto-Onkogen met

Dem Proto-Onkogen c-met kommt eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung zu.

20 Lit.: Park et al.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 6379-6383, 1987.

#### **STAT5 (Signal transduction and activator of transcription 5)**

25 STAT's sind eine Familie von Proteine, die sowohl Signaltransduktions-Funktion ausüben, als auch Transkriptionsaktivatoren sind.

Lit.: Darnell; PNAS 93: 6221-6224, 1996.

#### **Surfactant-Proteine**

Synonyme: Surfactant Protein (SP)-A, -B, -C; -D

30 Surfactant-Protein A wird z.B. nur von Alveolarepithelzellen Typ II und Clara-Zellen im Lungengewebe und SP-C exklusiv nur von Alveolarzellen Type II exprimiert. Es existieren mehrere Surfactant-Proteine (A1 und A2, B, C und D), deren Expression (z.B. mRNA) in metastatischen, mikrometastatischen, pulmonären und extrapulmonären Adenokarzinomen, nichtklein-  
35 zelligen Lungenkarzinomen und Mammakarzinomen beschrieben wurde.

Lit.: Betz et al.; Cancer Res. 55: 4283-4286, 1995.

**Telomerase**

Telomerasen definieren die Enden von Chromosomen.

Lit.: Morin G.B., et al.; Nature 353, 454-456, 1991.

Blackburn E.H.; Nature 350, 569-573, 1991.

5

**TGF-alpha (Transforming growth factor alpha)**

Synonyme: MDGF-2 (milk-derived growth factor 2); TGF-1; TCGF (transformed cell growth factor)

10 TGF-alpha wird von einer großen Anzahl von Karzinomen und (durch virale oder zelluläre Onkogene) transformierten Zelllinien exprimiert. Es kann als autokriner Wachstumsfaktor bei Ovarkarzinomen oder als hämatopoetischer Wachstumsfaktor wirken und bei der Vaskularisation von Tumorgewebe eine Rolle zu spielen.

15 Lit.: Derynck; Advances in Cancer Research 58: 27-52, 1992.

**TIMP (Tissue inhibitors of metalloproteinases)**

Die TIMP's gehören zu einer Familie von Inhibitoren, welche die Aktivität von Metalloproteinasen hemmen, damit der Gewebeauflösung entgegenwirken und auch die Invasion und Metastase von Karzinomzellen in das Gewebe mitbestimmen.

20

Lit.: Apte et al.; Genomics 19: 86-90, 1994.

**TNF-alpha (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha)**

25 Synonyme: Cachectin; Monocyte/Macrophage-derived TNF; cytotoxin (CTX); endogenous pyrogen; TNF-a  
TNF-alpha übt einen direkten cytotoxischen und apoptotischen Effekt auf Tumorzellen aus.

Lit.: Wang et al.; Science 228: 149-154, 1985.

30

**TNF-R1 p55**

Synonyme: CD120a; cytotoxischer TNF-R

TNF-R1 steht für den humanen Tumor-Nekrosis-Faktor-Rezeptor 1 und vermittelt hauptsächlich die Cytotoxizität und Apoptose.

35 Lit.: Loetscher H., et al.; Cell 61, 351-59, 1990.

**TNF-R2 p75**

Synonym: C120b; TNFBR

TNF-R2 vermittelt hauptsächlich die T-Zellaktivierung.

Lit.: Beltinger C.P.; Genomics 35, 94-100, 1996.

### **Topoisomerase II**

- 5    Synonyme: TOPO; TOP2A; Topoisomerase Alpha  
DNA-Topoisomerasen sind ATP-abhängige Enzyme, die den  
topologischen Status der DNA kontrollieren. Eine Chemo-  
resistenz kann in solchen Tumoren gefunden werden, in denen  
die Aktivität der Topoisomerase herabgesetzt ist, wie  
10    beispielsweise durch eine reduzierte Expression. Weiterhin  
wurde eine Mutation des Topoisomerase-Gens aus chemoresis-  
tenten Zelllinien isoliert, die bewirkt, daß das Enzym nicht  
mehr durch das Chemotherapeutikum inhibiert wird.  
Lit.: Hinds et al.; Cancer Research 51: 4729-4731, 1991.

15

### **Translokationen und Rearrangements**

#### **B- und T-Zellrezeptor-Rearrangements**

- Im Verlauf der Differenzierung von B-Zellen werden die  
20    Immunglobulin(Ig)-Gene und während der Reifung von T-Zellen  
wird der T-Zell-Rezeptor (TCR) rearrangiert. Findet sich im  
Blut eines Patienten eine Vermehrung eines T-Zell Klonen,  
läßt sich hinter dem polyklonalen Hintergrund aller  
restlichen T-Lymphozyten diese identifizieren.  
25    Lit.: Trainor et al.; Blood, 78, 192-196, 1991.  
Lehman et al.; Hematopathology, 103, 171-176, 1995.

#### **Translokation (14;18)**

- Diese Translokation ist die häufigste in humanen Lymphomen.  
30    Sie findet sich in mehr als 80% der follikulären Lymphome, in  
ca. 20% der diffusen großzelligen Lymphome und in ca. 50% der  
adulten undifferenzierten Lymphome.  
Lit.: Barker et al.; Blood, 83, 1079-1085, 1994.

#### **Translokation (9;22)**

Synonyme: Philadelphia-Chromosom, BCR/ABL

Das Philadelphia-Chromosom kommt durch eine reziproke Trans-  
lokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 zustande, die bei

- ca. 90% der Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) in den Tumorzellen zu beobachten ist. In geringerer Inzidenz findet sich dieses Rearrangement auch bei akuten lymphatischen Leukämien. Es resultieren nur 3 verschiedene  
5 mögliche Fusionstranskripte, die zum Nachweis einer CML bzw. "minimal residual disease" genutzt werden können.

Lit.: Maurer et al.; The Lancet, 337, 1055-1058, 1991

#### **Translokationen (2;13) und (1;13)**

- 10 In 68% der alveolären Rhabdomyosarkome findet sich als eine spezifische cytogenetische Anomalität die Translokation (2;13), in welche die Gene der Transkriptionsfaktoren PAX3 (Chromosom 2) und FKHR (Chromosom 13) involviert sind.  
14% der alveolären Rhabdomyosarkome weisen die Translokation  
15 (1;13) auf, wobei statt des PAX3-Gens auf Chromosom 2 das PAX7-Gen auf Chromosom 1 involviert ist.

Lit.: Sreekantaiah et al.; American J. Pathol., 144: 1121-1134, 1194.

#### **20 Translokation (x;18)**

Diese Translokation findet sich in 91% aller Synovialsarkome. Beteiligt sind das SSX-Gen von Chromosom X und das SYT-Gen von Chromosom 18, was zu einem Fusionstranskript, das  
25 vermutlich eine Schlüsselposition bei der Tumorentwicklung einnimmt.

Lit.: Clark et al.; Nature Genetics, 7, 502-508, 1994.

#### **Translokation (12;16)**

- Bei dieser Translokation, die in 77% aller myxoiden  
30 Liposarkome vorkommt, sind die Gene des Transkriptionsfaktors CHOP (Chromosom 12) und das FUS-Gen (Chromosom 16), dessen Funktion bislang unbekannt ist, involviert.

Lit.: Rabbits et al.; Nature Genetics, 4, 175-180, 1993.

#### **35 Translokation (11;22)**

Diese Translokation findet sich in 86% aller Ewing's Sarkome und hat die Bildung eines Fusionstranskriptes zur Folge, das aus dem EWS-Gen (Chromosom 22) und dem FLI-Gen (Chromosom 11)

besteht.

Lit.: West et al.; J. Clin. Oncol., 15, 583-588, 1997.

#### **$\alpha$ -und $\beta$ -Tubulin**

- 5 Tubuline stellen die Monomerbestandteile der Mikrotubuli des Cytoskeletts dar.

Lit.: J. Biol. Chem. 272:2534 (1997).

#### **Tyrosinase**

- 10 Die Tyrosinase ist ein Schlüsselenzym der Melanin-Synthese, das ausschließlich in Melanozyten und Melanomzellen exprimiert wird. Der Nachweis Tyrosinase-exprimierender Zellen im Blut weist daher auf das Vorhandensein zirkulierender Melanomzellen im Blut hin.
- 15 Lit.: Giebel et al.; Genomics 9. 435-445, 1991.

#### **UPA (Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator) und PAI-1 (Plasminogenaktivator-Inhibitor-1)**

- UPA ist ein proteolytisches Enzym, dessen Expression mit
- 20 einer gesteigerten Invasivität, tumorassoziiierter Angiogenese und Metastasierung korreliert. Seine Aktivität wird durch einen Inhibitor (PAI-1) reguliert. Untersuchungen unter anderem am primären Mammakarzinom und Magenkarzinom haben gezeigt, daß hohe Level an UPA mit einer schlechten Prognose
- 25 einhergehen. In Übereinstimmung damit findet sich in aggressiven Tumorzellen keine Expression von PAI-1. Das Gleichgewicht von UPA und PAI-1 bildet also einen prognostischen Parameter für die Metastasierungs- und Angiogenesefähigkeit eines Tumors.
- 30 Lit.: Ito et al.; Virchows Arch. 427:487-497, 1996.

#### **VEGF (Vaskularer Endothelialer Wachstumsfaktor)**

Synonyme: VPF; vascular permeability factor; vasculotropin; CD(glioma-derived)-VEGF

- 35 VEGF kann als Folge alternativen Splicens der mRNA in vier Formen auftreten, nämlich VEGF121 und VEGF165 sowie VEGF189 und VEGF206. VEGF scheint eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Blutgefäßformation und -permeabilität zu



spielen und darüber hinaus ein Hauptregulator der Tumorangiogenese zu sein.

Lit.: Leung et al.; Science 246: 1306-1309, 1989.

Tischer et al.; J. Biol. Chem. 266: 11947-11954, 1991.

5

#### **VEGF-R1 (VEGF-Rezeptor 1)**

Synonyme: FMS-like Tyrosine kinase-1; flt1 vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor; oncogene flt

- 10 Vielfach wird eine erhöhte Expression von VEGF-R1 in Karzinomen beschrieben.

Lit.: Shibuya et al.; Oncogene 5: 519-524, 1990.

#### **VEGF-R2 (VEGF-Rezeptor-2)**

- 15 Synonyme: KDR; Tyrosine kinase growth factor receptor; FLK-1 receptor for vascular endothelial growth factor; FLK1; kinase insert domain receptor

Die Hochregulation von VEGF-mRNA in Tumorzellen und der mRNA seiner Rezeptoren in der Tumervaskulatur korreliert mit einer  
20 erhöhten Aggressivität des Tumors. VEGF-R2 wird außerdem in Melanom- und Ovar tumorzellen transkribiert.

Lit.: Terman et al.; Oncogene 6: 1677-1683, 1991;

Boock et al.; J. Natl. Cancer Inst. 87: 506-516, 1995.

- 25 **VHL (Von Hippel-Lindau Syndrom)**

Das VHL-Genprodukt ist ein Tumorsuppressor-Protein, das bei erblichen Mutationen zu Nierenkarzinomen, Hämangiomen von Kleinhirn und Retina, Phäochromocytomen und Ependymomen führt. Eine Beteiligung an der Entstehung spontaner Tumoren

- 30 konnte ebenfalls gezeigt werden.

Lit.: Latif et al.; Science 260: 1317-1320, 1993.

#### **Virale Onkogene**

Von besonderer Bedeutung für die virale Onkogenese sind

- 35 Hepatitis-B- und -C-Viren, gegebenenfalls auch SV40, in Bezug auf Leberzellkarzinome, das HTLV-1-Virus im Zusammenhang mit T-Zell-Lymphomen, das Epstein Barr Virus (EBV) im Zusammenhang mit Burkitt-Lymphomen, Nasopharyngeal-Karzinomen und der

Hodgkin-Erkrankung und humane Papillomaviren der Typen 16 und 18 im Zusammenhang mit Karzinomen im Urethro-Genital Bereich, insbesondere der Cervix.

- Weiterhin werden Herpesviren der Typen 4 und 6 und das HI-  
5 Virus im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren diskutiert.

**Lit.:** Mueller M.; Environ. Health Perspect. 103 (1995) Suppl.8, 259-261.

10 *Leberzellkarzinome*

**Lit.:** De-Vita S. et al.; Blood 86 (1995) 1887-1892.

Koike K.; Intervirology 38 (1995) 134-142.

Casola S. et al.; Acta Genet. Med. Gemellol Roma 45 (1996) 221-225.

- 15 E Hara et al.; Dev.Genet. 18 (1996) 161-172.

*Urethro-Genital-Karzinome (Cervixkarzinome, Zervikalkarzinome, Vulvakarzinome, Prostatakrebs, Analkrebs, Blasenkrebs)*

- 20 **Lit.:** Beyer-Finkler E. et al.; Intervirology 38 (1995) 173-180.

Moyet-Lalle C. et al.; Int. J. Cancer 64 (1995) 124-129.

25 *Lymphome (Non-Hodgkin-Lymphome, Burkitt-Lymphome, T-Zell-Lymphome, B-Zell-Lymphome)*

**Lit.:** Lee J.H. et al.; J. Korean Med. Sci. 10 (1995) 399-405;

Tomita Y. et al.; Leuk. Lymphoma 19 (1995) 129-134.

Wang C.Y. et al.; Mayo Clin. Proc. 70 (1995) 665-672;

Maroushek S.R. et al.; Microb. Pathog. 19 (1995) 317-333.

30

*Lungenkarzinome*

**Lit.:** Hogg J.C., Hegele R.G.; Semin Resp. Infect. 10 (1995) 244-253.

35 **WT1**

Bei den Wilms-Tumoren handelt es sich um Nierentumore des Kindes. Es handelt sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein Tumorsuppressorgen.

WO 99/10528

89

PCT/EP98/05360

**Lit.:** Bonetta L., et al.; Cytogenet. Cell Genet. 51, 1989.  
Gessler M., et al.; Genomics 12, 807-813, 1992.

5

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Verfahren zur Charakterisierung disseminierter und  
10 mikrometastasierter Krebszellen anhand von DNA und/oder  
RNA, wobei man  
aus Körperflüssigkeit eines Individuums gewonnene Zellen  
anhand von mRNA auf wenigstens ein krebsspezifisches Gen  
untersucht; und/oder  
15 aus Körperflüssigkeit eines Individuums abgetrennte  
Krebszellen anhand von DNA und/oder mRNA auf wenigstens  
ein krebsspezifisches Gen untersucht und die gleiche  
Untersuchung mit Nichtkrebszellen desselben Individuums  
zum Vergleich durchführt.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  
anhand von mRNA Expressionsanalysen derjenigen  
krebsspezifischen Gene vorgenommen werden, die bei  
Nichtkrebszellen der untersuchten Körperflüssigkeit im  
25 wesentlichen nicht exprimiert werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß  
man mRNA der Gene CEA, CK20, MUC1, Tyrosinase und/oder  
MAGE3 untersucht.
- 30 4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß  
man genomische DNA der Gene p53, erb-B2, c-myc, K-ras,  
RB, APC und/oder DCC untersucht.
- 35 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, daß man genomische DNA auf  
Mutationen, Amplifikationen, LOH's, Translokationen  
und/oder Polymorphismen von Onkogenen und/oder mutierten  
Tumorsuppressor-Genen untersucht.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, daß man die Zellen und/oder  
die Krebszellen zusätzlich auf wenigstens ein  
5 krebsassoziiertes Gen untersucht und die gleiche  
Untersuchung mit Nichtkrebszellen desselben Individuums  
zum Vergleich durchführt.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß  
10 man auf gewebsspezifische Gene, metastasierungsassozi-  
ierte Gene, Steroidhormonrezeptor-Gene, Chemoresistenz-  
Gene, und/oder Gene, die mit der Immunmodulation,  
Zellproliferation und/oder Apoptose korrelieren,  
untersucht.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß  
15 man auf metastasierungsassoziierte Gene untersucht, die  
für Angiogenesefaktoren, Motilitätsfaktoren,  
Wachstumsfaktoren, Matrixdegradationsfaktoren, wie  
20 Proteinasen und deren Hemmstoffe, und/oder  
Adhäsionsfaktoren, wie Adhaerine, kodieren.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch  
gekennzeichnet, daß man mRNA untersucht.
- 25 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß  
man mRNA der Gene bFGF, bFGF-R, VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2  
MMP2 und/oder TIMP3 untersucht.
- 30 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche,  
dadurch gekennzeichnet, daß man Krebszellen aus der  
Körperflüssigkeit oder aus zellhaltigen Fraktionen davon  
durch Immunadsorption, Mikro-Filtration oder  
Dichtegradientenzentrifugation abtrennt.
- 35 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß  
man einzelne Krebszellen abtrennt und diese auch einzeln  
untersucht.

13. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12 zur in-vitro Diagnose von Krebs.
- 5 14. Verwendung von disseminierten und mikrometastasierten, durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 charakterisierten Krebszellen zum Testen von Wirkstoffen auf antineoplastische Wirkung.
- 10 15. Mittel zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 12, enthaltend geeignete Primer, Sonden und/oder Positiv-/Negativkontrollen und gegebenenfalls weitere zur Charakterisierung von DNA und/oder RNA übliche Mittel.
- 15 16. Mittel nach Anspruch 15 in Form einer Zusammenstellung von Test- und/oder Diagnosekits.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/05360

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 35808 A (CENTOCOR BV ;BRAKENHOFF RUDOLF HENRIKUS (NL); DONGEN AUGUSTINA ANT) 14 November 1996 see the whole document ---	1,2,4-9, 11,13,14
X	WO 96 17080 A (IMP CANCER RES TECH ;SELBY PETER JOHN (GB); BURCHILL SUSAN ANN (GB) 6 June 1996 see the whole document ---	1-3,5-7, 9,13,15, 16
X	WO 94 10343 A (UNIV JEFFERSON) 11 May 1994 cited in the application see the whole document ---	1,2,5-7, 9,11,13
X	WO 96 29430 A (WAYNE JOHN CANCER INST ;NAT GENETICS INST (US)) 26 September 1996 see the whole document ---	1-3,6,8, 9,11,13, 15,16
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 February 1999

Date of mailing of the international search report

18/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Knehr, M

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 98/05360

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PANTEL K AND RIETHMÜLLER G: "Methods for detection of micrometastatic carcinoma cells in bone marrow, blood, and lymph nodes" ONKOLOGIE, vol. 18, 1995, pages 394-401, XP002092612 see the whole document ---	1-6,9, 13,14
X	PELKEY J P ET AL.: "Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastases from solid tumors" CLINICAL CHEMISTRY, vol. 42, no. 9, 1996, pages 1369-1381, XP002092613 see abstract see page 1369, column 1, paragraph 1 - page 1370, column 1, paragraph 1 see page 1373, column 1, paragraph 3 - page 1375, column 2, paragraph 3; table 4 ---	1-4,6-9, 13
X	NOGUCHI S ET AL.: "The detection of breast carcinoma micrometastasis in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction" CANCER, vol. 74, no. 5, 1994, pages 1595-1600, XP002092614 see abstract see page 1595, column 2, paragraph 2 - page 1597, column 2, paragraph 1; figures 1-4; table 1 ---	1-3,6,7, 9,13
X	PITTMAN K ET AL.: "Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for expression of tyrosinase to identify malignant melanoma cells in peripheral blood" ANNALS OF ONCOLOGY, vol. 7, 1996, pages 297-301, XP002092615 see abstract see page 297, column 1, paragraph 1 - page 298, column 2, paragraph 2; figures 1-3; table 1 --- -/--	1-3,6,9, 13



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 98/05360

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JUNG R ET AL.: "Quality management and influential factors for the detection of single metastatic cancer cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction" EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY AND CLINICAL BIOCHEMISTRY, vol. 35, no. 1, 1997, pages 3-10, XP002092616 see abstract see page 3, column 2, paragraph 2 - page 5, column 1, paragraph 7 see page 6, column 2, paragraph 2 - page 7, column 1, paragraph 3; figures 1,4; table 1	1-3,6,7, 9,12,13
X	VAN DER VELDE-ZIMMERMANN D ET AL.: "Molecular test for the detection of tumor cells in blood and sentinel nodes of melanoma patients" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 149, no. 3, 1996, pages 759-764, XP002092617 see abstract see page 759, column 2, paragraph 2 - page 761, column 1, paragraph 2 see page 762, column 1, paragraph 3 - page 763, column 1, paragraph 1; figure 1; table 1	1-3,6,7, 9,13
X	BURCHILL S A ET AL.: "Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase - polymerase chain reaction" BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 71, 1995, pages 278-281, XP002092618 see abstract see page 278, column 1, paragraph 1 - page 279, column 1, paragraph 2; figures 1-4	1-3,6,7, 9,13
X	SMYTH M J ET AL.: "Antitumor activity of idarubicin-monoclonal antibody conjugates in a disseminated thymic lymphoma model" CANCER RESEARCH, vol. 51, 1991, pages 310-317, XP002092619 see the whole document	14
Y	WO 97 07242 A (LEHRER STEVEN) 27 February 1997 see the whole document	1,2,5-9, 11,13
	-/--	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 98/05360

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCHMITZ-DRÄGER B J ET AL.: "Molecular biology of dissemination in bladder cancer - laboratory findings and clinical significance" WORLD JOURNAL OF UROLOGY, vol. 14, 1996, pages 190-196, XP002092620 see the whole document -----	1,2,4-9, 11,13
Y	WO 95 16792 A (STROUN MAURICE ;ANKER PHILIPPE (CH); VASIOUKHIN VALERI (US)) 22 June 1995 cited in the application see the whole document -----	1,2,4,6, 7,13

# INTERNAL JAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/05360

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9635808 A	14-11-1996	AU 2375895 A EP 0828852 A	29-11-1996 18-03-1998
WO 9617080 A	06-06-1996	NONE	
WO 9410343 A	11-05-1994	CA 2148350 A EP 0667920 A JP 8502889 T US 5506106 A US 5674682 A US 5688649 A	11-05-1994 23-08-1995 02-04-1996 09-04-1996 07-10-1997 18-11-1997
WO 9629430 A	26-09-1996	AU 5310296 A EP 0871768 A	08-10-1996 21-10-1998
WO 9707242 A	27-02-1997	NONE	
WO 9516792 A	22-06-1995	CH 686982 A AU 1075695 A GB 2299166 A,B	15-08-1996 03-07-1995 25-09-1996

# INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05360

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 6 C12Q1/68

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>2</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 35808 A (CENTOCOR BV ;BRAKENHOFF RUDOLF HENRIKUS (NL); DONGEN AUGUSTINA ANT) 14. November 1996 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4-9, 11,13,14
X	WO 96 17080 A (IMP CANCER RES TECH ;SELB PETER JOHN (GB); BURCHILL SUSAN ANN (GB) 6. Juni 1996 siehe das ganze Dokument ---	1-3,5-7, 9,13,15, 16
X	WO 94 10343 A (UNIV JEFFERSON) 11. Mai 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1,2,5-7, 9,11,13

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

<sup>2</sup> Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

8. Februar 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

18/02/1999

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Knehr, M

# INTERNATIONAL & RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05360

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96 29430 A (WAYNE JOHN CANCER INST ;NAT GENETICS INST (US)) 26. September 1996  siehe das ganze Dokument ----	1-3,6,8, 9,11,13, 15,16
X	PANTEL K AND RIETHMÜLLER G: "Methods for detection of micrometastatic carcinoma cells in bone marrow, blood, and lymph nodes" ONKOLOGIE, Bd. 18, 1995, Seiten 394-401, XP002092612 siehe das ganze Dokument ----	1-6,9, 13,14
X	PELKEY J P ET AL.: "Molecular and immunological detection of circulating tumor cells and micrometastases from solid tumors" CLINICAL CHEMISTRY, Bd. 42, Nr. 9, 1996, Seiten 1369-1381, XP002092613 siehe Zusammenfassung siehe Seite 1369, Spalte 1, Absatz 1 - Seite 1370, Spalte 1, Absatz 1 siehe Seite 1373, Spalte 1, Absatz 3 - Seite 1375, Spalte 2, Absatz 3; Tabelle 4 ----	1-4,6-9, 13
X	NOGUCHI S ET AL.: "The detection of breast carcinoma micrometastasis in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction" CANCER, Bd. 74, Nr. 5, 1994, Seiten 1595-1600, XP002092614 siehe Zusammenfassung siehe Seite 1595, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 1597, Spalte 2, Absatz 1; Abbildungen 1-4; Tabelle 1 ----	1-3,6,7, 9,13
X	PITTMAN K ET AL.: "Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for expression of tyrosinase to identify malignant melanoma cells in peripheral blood" ANNALS OF ONCOLOGY, Bd. 7, 1996, Seiten 297-301, XP002092615 siehe Zusammenfassung siehe Seite 297, Spalte 1, Absatz 1 - Seite 298, Spalte 2, Absatz 2; Abbildungen 1-3; Tabelle 1 ----- -/-	1-3,6,9, 13

# INTERNATIONALER FORSCHUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05360

## C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>JUNG R ET AL.: "Quality management and influential factors for the detection of single metastatic cancer cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction" EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY AND CLINICAL BIOCHEMISTRY, Bd. 35, Nr. 1, 1997, Seiten 3-10, XP002092616  siehe Zusammenfassung  siehe Seite 3, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 5, Spalte 1, Absatz 7  siehe Seite 6, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 7, Spalte 1, Absatz 3; Abbildungen 1,4; Tabelle 1</p> <p>---</p>	1-3,6,7, 9,12,13
X	<p>VAN DER VELDE-ZIMMERMANN D ET AL.: "Molecular test for the detection of tumor cells in blood and sentinel nodes of melanoma patients" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, Bd. 149, Nr. 3, 1996, Seiten 759-764, XP002092617  siehe Zusammenfassung  siehe Seite 759, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 761, Spalte 1, Absatz 2  siehe Seite 762, Spalte 1, Absatz 3 - Seite 763, Spalte 1, Absatz 1; Abbildung 1; Tabelle 1</p> <p>---</p>	1-3,6,7, 9,13
X	<p>BURCHILL S A ET AL.: "Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase - polymerase chain reaction" BRITISH JOURNAL OF CANCER, Bd. 71, 1995, Seiten 278-281, XP002092618  siehe Zusammenfassung  siehe Seite 278, Spalte 1, Absatz 1 - Seite 279, Spalte 1, Absatz 2; Abbildungen 1-4</p> <p>---</p>	1-3,6,7, 9,13
X	<p>SMYTH M J ET AL.: "Antitumor activity of idarubicin-monoclonal antibody conjugates in a disseminated thymic lymphoma model" CANCER RESEARCH, Bd. 51, 1991, Seiten 310-317, XP002092619  siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	14
Y	<p>WO 97 07242 A (LEHRER STEVEN)  27. Februar 1997  siehe das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1,2,5-9, 11,13

-/--

# INTERNATIONALLER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP 98/05360

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	SCHMITZ-DRÄGER B J ET AL.: "Molecular biology of dissemination in bladder cancer - laboratory findings and clinical significance" WORLD JOURNAL OF UROLOGY, Bd. 14, 1996, Seiten 190-196, XP002092620 siehe das ganze Dokument ----	1,2,4-9, 11,13
Y	WO 95 16792 A (STROUN MAURICE ;ANKER PHILIPPE (CH); VASIOUKHIN VALERI (US)) 22. Juni 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument -----	1,2,4,6, 7,13

# INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/05360

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9635808 A	14-11-1996	AU 2375895 A EP 0828852 A	29-11-1996 18-03-1998
WO 9617080 A	06-06-1996	KEINE	
WO 9410343 A	11-05-1994	CA 2148350 A EP 0667920 A JP 8502889 T US 5506106 A US 5674682 A US 5688649 A	11-05-1994 23-08-1995 02-04-1996 09-04-1996 07-10-1997 18-11-1997
WO 9629430 A	26-09-1996	AU 5310296 A EP 0871768 A	08-10-1996 21-10-1998
WO 9707242 A	27-02-1997	KEINE	
WO 9516792 A	22-06-1995	CH 686982 A AU 1075695 A GB 2299166 A, B	15-08-1996 03-07-1995 25-09-1996